

Nachweis des β A4-Proteins mittels

NIR:

Eine in vitro Machbarkeitsstudie

DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor medicinae (Dr. med.)

Vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät der

Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Wiebke Brigitte Albrecht, geboren am 20.04.1979 in Lauterbach/Hessen

Gutachter:

1. PD. Dr. I. Hilger, FSU Jena.....
2. Prof. Dr. D. Gottschild, FSU Jena.....
3. Prof. Dr. S. Diekmann, IMB Jena.....

Tag der öffentlichen Verteidigung: 04.07.2005

For Ted,
someone I will always look up to

ABKÜRZUNGEN

SANIRF	Small Animal Near Infrared Fluorescence Imager
°C	Grad Celsius
Abb.	Abbildung
ACN	Acetonitril
Aqua dest.	destilliertes Wasser
APP	Amyloid-Vorläufer-Protein
a.p.	anteriorer- posteriorer Strahlengang (Röntgen)
b.E.	beliebige Einheit
BSA	Bovine Serum Albumin (Rinderserumalbumin)
BSB	(<i>trans-trans</i>),-1-bromo-2,5-bis-(3-hydroxycarbonyl-4-hydroxy)styrylbenzene
bzw.	beziehungsweise
CT	Computertomographie
d.h.	das heißt
et al.	et aliae (und andere)
etc.	et cetera
FIAU	2'-Fluoro-5-Iodovinyl-1-β-D-Arabinofuranosyl-Uracil
g	Gramm
h	Stunde(n)
HPLC	Hochdruckflüssigkeitschromatographie

kV	Kilovolt
mAS	Milliamperesekunde
mg	Milligramm
min	Minute(n)
ml	Milliliter
mM	Millimolar
MRT	Magnetresonanztomographie
nm	Nanometer
nmole	Nanomole
µg	Mikrogramm
µM	Mikromolar
µmole	Mikromole
µl	Mikroliter
NSE	Neuron-spezifische-Endolase
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
PET	Positronen-Emissions-Tomographie
pH-Wert	negativer dekadischer Logarithmus der Hydroniumionenkonzentration
pmole	Pikomole
ROI	Region of interest
RT	Retentionszeit
s	Standardabweichung

SPECT	Single-Photon-Emissions-Computertomographie
Tab.	Tabelle
TFA	Trifluoroacetic acid
W	Watt
\bar{x}	Mittelwert

Inhaltsverzeichnis:

1	ZUSAMMENFASSUNG.....	9
2	EINLEITUNG.....	11
3	MATERIALIEN UND METHODEN	22
3.1	MESSUNGEN MIT DEM SMALL ANIMAL NEAR INFRARED FLUORESCENCE IMAGER (SANIRF) UND DEREN STATISTISCHE AUSWERTUNG.....	22
3.2	BESCHREIBUNG DES VERWENDETEN D-PEPTIDS	24
3.3	BESCHREIBUNG DES VERWENDETEN CYANINFARBSTOFFES (CY5.5)	24
3.4	ERPROBUNG EINER TWO-STEP FLUOROCHROMEN SONDE AN HIRNGEWEBSSCHNITTEN	
	VON ALZHEIMERPATIENTEN	25
3.4.1	Arbeitsutensilien	25
3.4.2	Nachweis der optischen Detektierbarkeit der two-step fluorochromen Sonde nach	
	Behandlung von humanen Alzheimerhirnschnitten	27
3.5	KONZEPTION UND ERPROBUNG EINER ONE-STEP FLUOROCHROMEN SONDE ZUR DETEKTION	
	VON ALZHEIMERPLAQUES IM SANIRF-IMAGER.....	31
3.5.1	Arbeitsutensilien	31
3.5.2	Kopplung des Cy5.5-Fluoreszenzfarbstoffes an das D-Peptid	33
3.5.3	Gewinnung der one-step fluorochromen Sonde durch Hochdruckflüssigkeits-	
	Chromatographie (HPLC).....	34
3.5.4	Charakterisierung der in der HPLC gewonnenen Eluate mittels Spectrometrie.....	35
3.5.5	Markierung des β A4-Proteins mit der konzipierten one-step fluorochromen Sonde	35
3.6	ERPROBUNG EINES MODELLFLUOROCHROMS AN PHANTOMEN	36
3.6.1	Arbeitsutensilien	36
3.6.2	Verhalten der detektierbaren Fluoreszenz des Modellfluorochroms in Abhängigkeit von	
	der Gewebeschichtdicke.....	38
3.6.3	In situ Detektierbarkeit der emittierten Fluoreszenz in Phantomen	40
3.6.4	Verhalten der Fluoreszenzintensitäten des Fluorochroms nach in situ Applikation.....	
	in Mäusegehirne	41
4	ERGEBNISSE.....	45
4.1	ERPROBUNG EINER TWO-STEP FLUOROCHROMEN SONDE AN HIRNGEWEBSSCHNITTEN	
	VON ALZHEIMERPATIENTEN	45
4.1.1	Alternative Darstellung der Alzheimerplaques mittels Immunhistologie	46
4.2	KONZEPTION UND ERPROBUNG EINER ONE-STEP FLUOROCHROMEN SONDE ZUR DETEKTION	
	VON ALZHEIMERPLAQUES IM SANIRF-IMAGER.....	47

4.2.1	Separation der fluorochromen Sonde	47
4.2.2	Charakterisierung der in der HPLC gewonnenen Eluate mittels Spectrofluorometrie.....	48
4.2.3	Erprobung der konzipierten one-step fluorochromen Sonde an Alzheimer- Gehirnschnitten.....	49
4.3	ERPROBUNG EINES MODELLFLUOROCHROMS AN PHANTOMEN	51
4.3.1	Verhalten der detektierbaren Fluoreszenz in Abhängigkeit von der Gewebeschichtdicke.....	51
4.3.2	In situ Detektierbarkeit der emittierten Fluoreszenz in Gehirnphantomen.....	54
4.3.3	Verhalten der Fluoreszenzintensitäten des Fluorochroms nach in situ Applikation..... in Mäusegehirne	57
5	DISKUSSION	59
5.1	ERPROBUNG EINER TWO-STEP FLUOROCHROMEN SONDE AN HIRNGEWEBSSCHNITTEN	
	VON ALZHEIMERPATIENTEN	59
5.1.1	Konzeption und Erprobung einer one-step fluorochromen Sonde zur Detektion	
	von Alzheimerplaques im SANIRF-Imager.....	64
5.2	ERPROBUNG EINES FLUOROCHROMS AN PHANTOMEN	66
6	LITERATURVERZEICHNIS	71
7	ANHANG	77

1 Zusammenfassung

Morbus Alzheimer ist eine degenerative Erkrankung des Gehirns, die durch Atrophie der Großhirnrinde, das Auftreten von amyloiden Plaques und pathologischen Fibrillenveränderungen gekennzeichnet wird. Jedoch kann diese Erkrankung noch nicht durch herkömmliche radiologische und klinische Verfahren nachgewiesen werden. Morbus Alzheimer kann bis zum heutigen Zeitpunkt nur als Ausschlussdiagnose festgestellt und erst *post mortem* anhand einer Autopsie definitiv bestätigt werden. Einer Forschungsgruppe in Jülich ist es nun gelungen, ein D-Peptid zu gewinnen, welches sich spezifisch an das β A4-Protein der Alzheimerplaques anlagert. Bisher konnte diese hohe spezifische Bindung des D-Peptids nur immunhistologisch *in vitro* nachgewiesen werden. Diese Studie soll nun einen Weg eröffnen, mit diesem D-Peptid eine hochaffine und spezifische Sonde zur Diagnose des Morbus Alzheimer zu konzipieren. Eine solche Sonde muss zum Einen aus einem spezifisch bindenden Substrat, dem beschriebenen D-Peptid, bestehen, zum Anderen aus einem optisch aktiven Liganden, der in einem Detektor sichtbar gemacht werden kann. Als passenden Liganden wählte man einen Cyaninfarbstoff aus, der im NIR-Bereich angeregt wird und fluoresziert. In diesem Bereich, dem sogenannten optischen Fenster, können Fluoreszenzintensitäten optimal detektiert werden, da in diesem Bereich Wasser, Fett und Hämoglobin den geringsten Absorptionskoeffizienten aufweisen. Als Detektor fungierte ein Prototyp-Ganzkörper-Fluoreszenzdetektor bestehend aus einem laserdichten Gehäuse, einem Diodenlaser zur Anregung von Farbstoffen bei 675 nm, einer digitalen CCD-Kamera zur Aufnahme von Emissionswellenlängen von 695 nm und einem angeschlossenen Computer mit einer Messsoftware zur Auswertung. Erstes Ziel der Studie war ein spezifischer Nachweis von Alzheimerplaques in Hirngewebsschnitten im Prototyp-Ganzkörper-Fluoreszenzdetektor durch eine konzipierte fluorochrome Sonde. Zur Darstellung von Alzheimerplaques wurden ein Zwei- und ein Einschrittverfahren angewandt. Dabei wurden zwei unterschiedliche Sonden verwendet. Bei der ersten Sonde wurden Substrat und Ligand getrennt voneinander, bei der zweiten die beiden Komponenten gekoppelt verabreicht. Beim Zweischnittverfahren wurden die Hirngewebsproben nacheinander zuerst mit dem D-Peptid und dann mit dem Fluoreszenzfarbstoff inkubiert. Eine Kopplung der beiden Komponenten der Sonde wurde dabei durch die Brückenmoleküle Biotin und Streptavidin erreicht. Diese Methode ist im Vergleich zum Einschnittverfahren einfacher und kostengünstiger und wurde angewandt, um zu testen, ob eine aufwendige Kopplung der beiden Komponenten zu einem Sondenmolekül

sinnvoll und erfolgversprechend ist. Beim Einschrittverfahren wurden zuerst die Komponenten D-Peptid und Fluoreszenzfarbstoff bei aneinander gekoppelt. Durch HPLC konnte das fluorochrom-markierte D-Peptid von freiem Farbstoff und freiem, nicht-markierten D-Peptid getrennt werden. Mit Spectrofluorometrie konnte das fluorochrom-markierte D-Peptid dann definitiv als solches identifiziert werden. Die Inkubation der Hirngewebsschnitte erfolgte dann mit der konzipierten fluorochromen Sonde. Im zweiten Teil der Studie wurde das beschriebene Fluorochrom auf seine spezielle Ein- bzw. Durchdringtiefe durch Hirngewebe getestet und der Einfluss der Schädelkalotte von Mäusen auf die Fluoreszenzintensität des Cy5.5 untersucht. Außerdem wurden geeignete Parameter wie Laserstärke des Prototyp-Fluoreszenzdetektors und die Konzentration des Fluorochroms für eine mögliche in vivo Applikation der fluorochromen Sonde in Kleintiere erprobt. Die Ergebnisse zeigten, dass in den Alzheimerhirnschnitten ab einer Hirngewebssdicke von über 100 μm und einer Konzentration des fluorochrom-markierten D-Peptids von 50 μM signifikante Fluoreszenzsignale im Prototyp-Ganzkörper-Fluoreszenzdetektor messbar waren. Im Vergleich mit Nicht-Alzheimergewebe und Negativkontrollen wurde festgestellt, dass es sich dabei nur um die Fluoreszenzsignale der mit der Sonde markierten βA4 -Plaques handeln konnte. Dabei konnten eine spezifische Markierung der Alzheimerplaques und deren Darstellung im Detektor sowohl durch das Ein- als auch das Zweischrittverfahren erreicht und nachgewiesen werden. Im Vergleich der beiden Sonden zeigte sich, dass sich unter gleichen Bedingungen die erreichten Fluoreszenzintensitäten nicht voneinander unterscheiden, es mit dem Einschrittverfahren aber zu weniger unspezifischen Markierungen des Gewebes kommt als nach Behandlung mit dem Zweischrittverfahren. Bei den Phantomversuchen konnten signifikante Fluoreszenzintensitäten bei Fluorochrommengen von 250 bis 1200 pmol bei Hirngewebsschichtdicken bis 5 mm im Detektor gemessen werden. Der Nachweis dieser Fluorochrommengen im Detektor ist wegweisend, da in vivo Mengen von 2000 pmol βA4 -Protein pro Gramm Alzheimerhirngewebe nachgewiesen werden müssen. Auch ließ sich der Farbstoff in situ im Gehirn einer Maus darstellen. Es ist naheliegend, dass sich dieses Fluorochrom durchaus für eine Darstellung in vivo eignet. Anhand der durchgeführten Versuche wurde eine Sonde zur spezifischen Detektion von Alzheimerplaques konzipiert und erprobt. Diese Sonde weist nun alle Eigenschaften auf, um in vivo Alzheimerplaques optisch nachweisen zu können.

2 Einleitung

Als „eigenartige Krankheit der Hirnrinde“ beschrieb 1906 der deutsche Psychiater Alois Alzheimer (1864-1915) die Krankheit, deren Symptome er bei einer 51-jährigen Patientin namens Auguste Deter in der „Städtischen Irrenanstalt Frankfurt/Main“ untersuchte. Bei Einlieferung konnte sich diese Patientin an wenig mehr als ihren Vornamen erinnern. Alzheimer testete ihre Reflexe, ihre sprachlichen und intellektuellen Fähigkeiten, konnte aber keine Diagnose stellen. Auch seine Kollegen notierten „allgemein verblödet“. Nach dem Tod Auguste Deters seziierte Alois Alzheimer das Gehirn der Patientin und fand Veränderungen der Hirnrinde sowie Eiweißablagerungen, verfilzte Faserbündel und tote Nervenzellen. Von besonderer Bedeutung war, dass im Gehirn keine Anzeichen von Arteriosklerose zu finden waren. Da diese Krankheit bis dahin unbekannt war, konnte Alzheimer ihr keinen Namen geben. Sein Lehrer Emil Kraepelin (1856-1926) benannte die Krankheit dann nach seinem Schüler (Morbus Alzheimer). Zur damaligen Zeit interessierte sich niemand für diese Erkrankung und auch 75 Jahre später wurde sie noch als exotische, selten auftretende Altersdemenz bezeichnet und in Lehrbüchern kaum erwähnt (A Med-World AG 2002, Activ Learning Group AG 2001).

Heute hat sich die Definition der Krankheit kaum verändert: „Meist im Präsenium (5. Jahrzehnt) auftretende Degenerationskrankheit mit Atrophie der Großhirnrinde, pathologischer Fibrillenveränderung und amyloiden Plaques.“ (Pschyrembel 1995). Der Morbus Alzheimer zählt zu den neurodegenerativen Erkrankungen, wobei 5-10 % aller Menschen jenseits des 65. Lebensjahres betroffen sind (Kleihues et al. 2001).

Im Zentrum der Untersuchungen stehen heute die mikroskopisch-pathologischen Veränderungen. Die alzheimertypischen Fibrillenveränderungen (tangles) sind Zytoskelettaggregate im Perikaryon von Neuronen. Sie enthalten als Hauptbestandteil periodisch gedrehte Neurofilamente, außerdem das mit Mikrotubuli assoziierte tau-Protein und das Stressprotein Ubiquitin (Kleihues et al. 2001). Es verhärtet sich jedoch zunehmend die Hypothese, dass das Auftreten der klinischen Symptome im Zusammenhang mit der Anzahl der Alzheimerplaques im Gehirn steht. Die Plaques sind vor allem für den Zelltod und den damit verbundenen Zellfunktionsverlust verantwortlich. Die im Neuropil gelegenen Alzheimerplaques enthalten einen Kern, der aus einem β A4-Amyloid-Protein besteht und von degenerierenden Neuriten und Astrozytenfortsätzen umsäumt wird (Kleihues et al. 2001).

Dieses β A4-Amyloid-Protein konnte erst 1985 identifiziert werden (Wong et al. 1985). Es ist ein Eiweißprotein bestehend aus 40 bis 42 Aminosäuren, das aus einem im Jahr 1987 entdeckten Vorläuferprotein, dem β -Amyloid-Precursor-Protein (APP), hervorgeht (Kang et al. 1987). APP wird durch α -, β - und γ -Sekretasen gespalten, wobei die β - und γ -Sekretasen das β A4-Amyloid-Protein hervorbringen (Selkoe 1998). Im gesunden Gehirn findet man ca. 90% der 40-Aminosäuren-langen Variante und ca. 10% des 42-Aminosäuren-langen β -Amyloid-Proteins. Bei einem Patient mit Morbus Alzheimer ist der Anteil der 42-Aminosäuren-langen Variante des β A4-Amyloid-Protein deutlich erhöht.

Wesentlich für eine Plaquebildung scheint die Struktur des β A4-Proteins zu sein. Das β A40-Protein liegt nach der Spaltung des APP als α -Helix vor, das β A42-Protein hingegen als β -Faltblatt. Die β -Faltblattstruktur ist im Gegensatz zur α -Helix wesentlich stabiler und aggregiert leichter. Zur Aggregation des β -Amyloid-Proteins kommt es durch mehrere Mechanismen, darunter eine erhöhte Freisetzung von β A4, ein verminderter Abbau, ein verminderter Abtransport sowie eine katalytische Wirkung von Radikalen (Hülser 1999).

Die senilen Ablagerungen befinden sich hauptsächlich im Hippocampus und im Temporallappen, in späteren Stadien auch in der gesamten Großhirnrinde. Sie sind auch in einem normalen Altersgehirn zu finden, jedoch liegt die Anzahl der Plaques mit über 15 Ablagerungen pro mm² im Alzheimergehirn deutlich höher. Das β A4-Amyloid-Protein kann auch in leptomeningealen und kortikalen Gehirngefäßen auftreten und wird dann als kongophile Angiopathie bezeichnet (Kleihues et al. 2001). Als cytotoxische Wirkung des β -Amyloid-Proteins wird vor allem der Einfluss auf den Acetylcholin-Stoffwechsel diskutiert. Dieser chemische Botenstoff ist für die Signaltransduktion der Nervenzellen unentbehrlich. Durch die Alzheimersche Erkrankung wird das Acetylcholin inaktiviert, so dass von gesunden Zellen ausgehende elektrische Signale nicht weitergeleitet werden können. Des Weiteren soll das Amyloid eine Erhöhung des oxidativen Stresses als auch eine Fehlregulation von Cytokinen bewirken. Doch sind die Prozesse, die den Tod der Nervenzelle herbeiführen, heute noch nicht vollständig verstanden und erforscht.

Das Gen für das β -Amyloid Vorläuferprotein liegt auf dem Chromosom 21. Eine Mutation des APP-Genes führt zu einer vermehrten Sekretion des β A42-Proteins. Das fast obligate Auftreten eines Morbus Alzheimer bei Patienten mit Trisomie 21 jenseits des 30. Lebensjahres deutet ebenfalls auf eine pathogenetisch wirksame Komponente auf Chromosom 21 hin. Auch die 1995 beschriebene Mutation der Gene für Presenilins 1 und 2

(Sekretasen) steigern die Sekretion dieses leicht aggregierenden Proteins (Cruts M et al. 1995, Rogaev et al. 1995, Oyama et al. 1998, Rocchi et al. 2003). Als weiterer Risikofaktor für die Entstehung von Alzheimer wurde das E4-Allel des Apolipoproteins E identifiziert, welches die Aggregation des β A4-Amyloid-Proteins beschleunigen soll (Morishima-Kawashima und Ihara 1998, Pahnke et al. 2003).

Eine medikamentöse Therapie von Alzheimer zielt auf die Ausschaltung der genannten Risikofaktoren ab. Jedoch ist eine ursächliche Behandlung der Alzheimer Demenz bisher nicht möglich. In den USA wurden allerdings schon Medikamente entwickelt, die das Fortschreiten der Demenz verlangsamen. Dabei handelt es sich vor allem um im Hirn wirksame Acetylcholinesterasehemmer wie z.B Tacrin, Donepezil und Rivastigmin. Potentiell finden hohe Dosen von Vitamin E oder Selegin zum Schutz vor freien Radikalen Anwendung. Um eine frühe Medikation für diese Patientengruppe zu finden, muss es allerdings möglich sein den Fort- bzw. Rückgang dieser Krankheit überprüfen zu können. Dazu wäre es sinnvoll durch bildgebende Verfahren die Amyloidplaques sichtbar zu machen, deren Anzahl mit dem Schweregrad dieser Erkrankung einhergeht.

Die Diagnose „Morbus Alzheimer“ kann bis heute nur klinisch anhand der Symptome, nämlich der Beeinträchtigung der kognitiven Gehirnleistungen mit Ausprägung einer Demenz, gestellt werden. Des Weiteren werden zum Ausschluss einer Alzheimer Demenz verschiedene radiologische Techniken herangezogen. Mit der Computertomographie (CT) kann eine Hirnatrophie sichtbar gemacht werden. Doch lässt diese keine Rückschlüsse auf die Ursache der Erkrankung zu, da eine Hirnatrophie erst im fortgeschrittenen Stadium der Demenz auftritt. Diese Methode kann also nur zum Ausschluss von Tumoren, Hydrozephalus und vaskulären Ursachen dienen. Die Magnetresonanztomographie (MRT) zeigt ebenso nur morphologische Veränderungen des Gehirns (Schonknecht et al. 2001). Bei dieser Methode werden Veränderungen der weißen Substanz besser dargestellt und dadurch sind krankhafte Prozesse verschiedenster Art im Marklager deutlicher sichtbar. Eine sichere Abgrenzung von vaskulären Erkrankungen ist allerdings nicht möglich. Eine weitere in der Radiologie übliche Methode ist die Single-Photon-Emissions-Computer-Tomographie (SPECT). Dabei wird die Verteilung von schwach radioaktiv markierten Stoffen gemessen und eine Momentaufnahme von Durchblutung und Stoffwechsel des Gehirns angezeigt. Bei Alzheimerpatienten ist schon im frühen Stadium eine seitengleiche Abnahme der Hirndurchblutung besonders im Temporal- und Parietallappen, später auch im Frontallappen feststellbar. Jedoch ist diese Methode zu unspezifisch, um eine Alzheimer Demenz von anderen Demenzen sicher

abzugrenzen. Die Methode kann allerdings dem Ausschluss von Hirndurchblutungsstörungen dienen. Mit der Positronen-Emissions-Tomographie (PET) können Stoffwechselvorgänge wie der Verbrauch von Zucker und Sauerstoff quantitativ gemessen werden. Im Scheitel-, Schläfen- und Frontallappen kann bei Patienten mit Morbus Alzheimer ein verminderter Zuckerverbrauch nachgewiesen werden. Dieser Prozess ist schon erfassbar, bevor im CT bzw. MRT Veränderungen der Hirnstruktur sichtbar werden. Doch sind mit dieser Technik keine Veränderungen im Hippocampus darstellbar, wo eine Atrophie zuerst auftritt und sich viele Alzheimerplaques nachweisen lassen. Es ist demnach keine Detektion im Frühstadium der Erkrankung möglich. Außerdem ist diese Methode sehr aufwendig, teuer und nicht beweisend. Sie erlaubt allerdings einen Ausschluss anderer Stoffwechselstörungen (Novartis 2002).

Um eine geeignete klinische Nachweismethode der Alzheimerschen Krankheit zu finden, konzentrierte sich die medizinische Grundlagenforschung bisher auf die Untersuchung des Liquors. Dabei wurde gezeigt, dass das phosphorylierte Tau-Protein bei Alzheimerpatienten gegenüber Gesunden deutlich erhöht ist, jedoch gilt dies auch bei Schlaganfällen, Normaldruck-Hydrocephalus, Entzündungen des Gehirns und bei der Creutzfeldt-Jakob-Krankheit. Der Gehalt an Amyloid-Vorläufer-Protein (APP) im Liquor kann bei Patienten mit Morbus Alzheimer verändert sein, allerdings sind höhere APP-Spiegel auch bei vaskulären Demenzen oder depressiven Pseudodemenzen im Liquor zu finden. Bei Abnahme der Nervenzellen und ihrer Synapsen kann ein spezielles Protein, die Neuron-spezifische Endolase (NSE), im Liquor nachgewiesen werden. NSE tritt auch bei Alzheimerpatienten auf. Eine Unterscheidung zur vaskulären Demenz kann aber mit dieser Methode nicht getroffen werden. Dies zeigt, dass auch eine Lumbalpunktion letztlich nur dem Ausschluss anderer Ursachen dienen kann, insbesondere der entzündlichen Prozesse (Novartis 2002). Demnach gibt zur Zeit keine verlässliche prämortale Nachweismethode. Eine Verifikation der Diagnose „Morbus Alzheimer“ kann heute erst postmortal anhand der mikroskopischen Veränderungen, Großhirnatrophie und Anwesenheit von Alzheimerfibrillen und -plaques geschehen (Möller et al. 1996). Bisher war dazu eine gezielte immunopathologische oder molekularbiologische In-vitro-Analyse nach Resektion oder Entnahme einer Biopsie notwendig (Högemann et al. 2001).

Daher ist die heutige Forschung bemüht eine Methode zu entwickeln, die eine spezifische Detektion des β A4-Proteins ermöglicht. Erste Ansätze zum Nachweis des β A4-Proteins

wurden mit der Sonde (*trans-trans*),-1-bromo-2,5-bis-(3-hydroxycarbonyl-4-hydroxy)styrylbenzene (BSB) durchgeführt. BSB bindet an senile Plaques in Alzheimerhirngewebsschnitten und intrazellulären β A4-Aggregaten. Herausragend ist die Tatsache, dass BSB auch nach i.v.-Injektion in die Schwanzvene von transgenen Mäusen die Blut-Hirn-Schranke überwindet und an intrazerebrale Ablagerungen in vivo bindet. Jedoch ist ein Nachweis der Lokalisation dieser Sonde nur in der vitro-Situation möglich. Hinzu kommt, dass BSB auch an Neurofibrillen, Lewy-Körperchen und Einschlüssen in Gliazellen von Alzheimerpatienten, Parkinsonpatienten und Patienten mit multipler-Systematrophie bindet. Der Nachweis mit BSB ist also nicht spezifisch für eine Alzheimersche Krankheit. Auch konnten Alzheimerplaques durch verschiedene Sonden mittels Multiphon Mikroskopie in vivo in transgenen Mäusen sichtbar gemacht werden (Bacsikai et al. 2001 a, Bacsikai et al. 2001 b, Klunk et al. 2002, Mathis et al. 2002). Jedoch war dazu jeweils eine Craniotomie notwendig, was bei einem routinemäßigen Scanning von Alzheimerpatienten ungünstig ist. Des Weiteren konnte ein Nachweis der senilen Plaques in vivo in transgenen Mäusen mit einem Gadolinium-markierten bzw. monocristallinen-Eisenoxid-Nanopartikeln-markierten L-Peptid (β A4₁₋₄₂) erbracht werden (Wadghiri et al. 2003). Jedoch weist ein L-Peptid im menschlichen Körper eine hohe Immunogenität und Instabilität auf.

Diese Bestrebungen zu einer in vivo Bildgebung von Alzheimerplaques zeigen, dass eine Darstellung auf molekularer Ebene erfolgversprechend ist. Beim Molecular imaging werden Zellmoleküle wie z.B. DNA, mRNA oder Proteine bildlich dargestellt. Diese neuen Ansätze zu Bildgebung von genetischen und biochemischen Veränderungen könnten der Schlüssel zu nicht-invasiver in vivo Detektion von Alzheimerplaques und wiederholt durchführbarem Monitoring sein. In der experimentellen Radiologie werden heute schon ansatzweise verschiedene Techniken eingesetzt, die je nach Fragestellung ihre Vor- und Nachteile aufweisen. Dazu müssen Sonden konzipiert werden, die aus zwei Komponenten, einem Bindungsabschnitt und einem Bildgebungsabschnitt, bestehen, damit sie das entsprechend nachzuweisende Zielmolekül binden und in einem bildgebenden Verfahren, wie z.B. MRT, SPECT oder PET, erkannt und dargestellt werden können. Das nuklearmedizinischen Verfahren PET kann Konzentrationen im picomolaren Bereich sichtbar machen. Es wird verwendet, wenn bereits ein Substrat zu dem Zielmolekül (Target) besteht, das mit einem Positron-emittierenden Liganden gekoppelt werden kann, wie z.B. befindliche 2'-Fluoro-5-Iodovinyl-1- β -D-Arabinofuranosyl-Uracil (FIAU) oder Ganciclovir. Diese Substrate werden verwendet, um die Expression der viralen Thymidin Kinase zum Nachweis der Lokalisation

von eingeschleusten Genen darzustellen (Marriott et al. 1994, Luker et al. 1997, Crankshaw et al. 1998, Schellingerhout et al. 1998, Weissleder 1999). Die Magnetresonanztomographie ist bezüglich der Detektion spezifischer Substrate um den Faktor $10^4 - 10^6$ weniger sensitiv. Doch verfügt sie über eine bessere räumliche Auflösung, die in der Schichtebene bereits bei klinisch eingesetzten Geräten im Bereich von μm (statt mm) liegt (Högemann et al. 2001). Außerdem können physiologische und anatomische Informationen gleichzeitig extrahiert werden, was die räumliche Zuordnung wesentlich vereinfacht. Anwendung soll diese Technik vor allem in der Bildgebung in transgenen Tieren und bei der Markierung von Zellen finden (Dodd et al. 1999, Schoepf et al. 1998). Eine weitere Technik ist die optische Bildgebung. Dazu gehören die optischen Detektionsgeräte im Nah-Infrarot-Bereich. Targets werden durch stark fluoreszierende Signale dargestellt. Dies ermöglicht eine Bildgebung von Enzymen, DNA und RNA sowie weiteren intrazellulären Zielmolekülen in vivo (Tyagi und Kramer 1996). Für die optische Bildgebung bietet sich der Nah-Infrarot-Bereich des Lichtspektrums besonders an, da im Wellenlängenbereich von 650 bis 900 nm Hämoglobin, der Hauptabsorbierer von sichtbarem Licht, und Wasser und Fett, die Hauptabsorbierer von infrarotem Licht, ihren geringsten Absorptionskoeffizienten aufweisen (Weissleder und Ntziachristos 2003). Das bedeutet, dass in diesem Bereich, dem sogenannten „diagnostischen Fenster“, die höchstmögliche Fluoreszenzintensität gemessen werden kann und die Eindringtiefe des NIR-Lichtes am größten ist (Weissleder und Ntziachristos 2003, König und Greulich 2003).

Ein solcher Prototyp-Ganzkörperdetektor für die optische Bildgebung, der im Nah-Infrarot-Bereich Fluoreszenzintensitäten nachweisen kann, wurde von der Firma Siemens entwickelt. Der Small Animal Near Infrared Fluorescence Imager (SANIRF) wurde konstruiert, um die Bildgebung von ausgewählten Zielmolekülen in vivo in der tierexperimentellen Situation zu erproben. Diese Erprobung der molekularen Detektion von Erkrankungen ist notwendig, um die Spezifität von Sonden zu überprüfen, deren verabreichte Konzentrationen zu optimieren und Parameter wie die Laserleistung, Belichtungszeit, Eindringtiefen etc. festzulegen. Sowie Risiken abzuschätzen, bevor die eigentlichen klinischen Untersuchungen beginnen können. Optimierte wurde dieser Detektor in erster Linie, um den Fluoreszenzfarbstoff Cy5.5 in Kleintieren zu messen. Damit wurde eine Grundvoraussetzung zu einer Detektion von Alzheimerplaques in vivo geschaffen. Bisher konnten schon Erfolge im Bereich der Tumordarstellung und dem Nachweis von entzündlichen Prozessen in Mäusen erzielt werden (Hansch et al. 2003a, Hansch et al. 2003b, Hilger et al. 2003).

Zum Nachweis von Alzheimerplaques in dem Prototyp-Ganzkörperdetektor muss sich eine fluorochrome Sonde aus zwei Bestandteilen zusammensetzen, einem optisch detektierbaren und einem spezifisch bindenden Teil. Um ein Molekül im Nah-Infrarot-Bereich darzustellen muss ein verwendeter Fluoreszenzmarker auch in diesem Bereich optimal fluoreszieren. Dazu bieten sich vor allem die Cyaninfarbstoffe an, da sowohl ihr Absorptions- als auch ihr Emissionsmaximum im Nah-Infrarot-Bereich liegen. Der bekannteste Cyaninfarbstoff ist Indocyaningrün, das bereits klinische Anwendung im Bereich der retinalen Angiographie und bei Leberfunktionstests findet (Slakter et al. 1995). Es wurde bereits an zehntausenden Patienten verwendet und die Anzahl der aufgetretenen Nebenwirkungen blieb äußerst gering (Hope-Ross et al. 1994). Als weiteres Beispiel wurde ein Cy5.5 Farbstoff der Firma Amersham als Fluoreszenzligand bei den bereits erwähnten Versuchen zum Nachweis von Tumoren verwendet (Weissleder et al. 1998). Dieses Molekül weist Excitations- und Emissionsmaxima bei Wellenlängen von 673 nm und 689 nm auf, was den Nachweis im Nah-Infrarot-Bereich ermöglicht. Dazu kommt, dass es leicht mit Antikörpern oder Proteinen gekoppelt werden kann, die den zweiten Bestandteil einer fluorochromen Sonde ausmachen. Weissleder stellte mit dem Fluorochrom unterschiedliche Zielmoleküle nach enzymatischer Aktivierung dar. Jedoch liegen keine Untersuchungen vor, die zeigen, dass dieses Fluoreszenzmolekül auch im Gehirn durch die Schädelkalotte detektierbar ist. Bekannt ist allerdings, dass NIR-Licht durch unterschiedliche Gewebetypen unterschiedlich stark abgeschwächt wird. Dieser Einfluß des umliegenden Gewebes auf die Fluoreszenzintensität ist entscheidend für die Diagnostik von Alzheimerplaques, da eine Detektion nicht-invasiv durchgeführt werden soll. Die senilen Plaques befinden sich im Gehirngewebe selbst, bevorzugt im Hippocampus, was noch von Hirnhäuten, Schädelkalotte und Haut bedeckt ist. Eine Eindringtiefe von NIR-Licht ins Gehirn von etwa 0,3 bis 0,8 cm im Gegensatz zum Brustgewebe mit 1,4 bis 2 cm wurde in einer Studie bestimmt (Weissleder und Ntziachristos 2003). Jedoch wurden keine Angaben über die Konzentration und Beschaffenheit der fluorochromen Moleküle gemacht, und es wurde auch ein anderer Detektor zur Darstellung des optisch-markierten Zielmoleküls verwendet. Deshalb wurde in der folgenden Studie ein Modellfluorochrom (Cy5.5) als möglicher Bestandteil einer fluorochromen Sonde anhand von Phantomen in vitro untersucht. Dabei wurde das Fluorochrom auf seine spezielle Ein- bzw. Durchdringtiefe ins bzw. durch Hirngewebe getestet und der Einfluß der Schädelkalotte auf die Fluoreszenzintensität des Cy5.5 untersucht. Außerdem wurden geeignete Parameter wie Laserstärke des Prototyp-Fluoreszenzdetektors und Konzentration des Fluorochroms für eine mögliche in vivo Applikation der fluorochromen Sonde in Kleintiere erprobt.

Der zweite Bestandteil der fluorochromen Sonde, der Bindungsteil, sollte spezifisch das β A4-Amyloid-Protein markieren. Zudem muss die Sonde die Blut-Hirn-Schranke überwinden und für einen gewissen Zeitraum stabil an das Zielmolekül binden. Darüber hinaus sollte sie in den verabreichten Mengen nicht toxisch sein bzw. kaum Nebenwirkungen aufweisen sowie nicht schon vor Erreichen der Bindungsstelle abgebaut werden. Außerdem sollte sie gut löslich sein und eine hohe Quantenausbeute aufweisen (Weissleder und Ntziachristos 2003).

Die Selektion eines solchen Sondenmoleküls erfolgte in sogenannten biologischen Bibliotheken durch Phage Display. Dabei werden Peptid-Bibliotheken als Fusionsproteine zu Hüllproteinen auf Phagen präsentiert und können spezifisch an Zielmoleküle (Targets) binden. Die Phagen tolerieren die Insertion der Fremdsequenz und können sich weiter vermehren. Ein Zielmolekül wird fest an eine Matrix gebunden. Durch Inkubation mit der Phagen-Bibliothek können sich die präsentierten Peptide spezifisch an das Zielmolekül anlagern. Phagen, die nicht an das Target binden werden herausgewaschen. Die so selektierten Phagen werden durch Elution mobilisiert, können dann in E.coli Bakterien weiter vermehrt und das Peptid bzw. Protein sequenziert werden (Collins und Röttgen 1997, Wiesehan 2003) (Abb. 1). Durch biologische Bibliotheken können jedoch nur L-Peptide selektiert werden. L-Peptide haben bei einer Anwendung in vivo jedoch den Nachteil, daß sie Nuklease- und Protease-sensitiv sind und zu einer heftigen Immunantwort führen können. Deshalb ist es sinnvoll, in chemisch-synthetischen Bibliotheken nach D-Enantiomeren der körpereigenen L-Aminosäuren zu suchen, die weniger Protease-sensitiv sind und kaum Immunreaktionen hervorrufen. Als Enantiomere bezeichnet man Moleküle, die die gleiche Strukturformel besitzen, sich jedoch aufgrund ihrer optischen Aktivität, d.h. der Anordnung ihrer chemischen Gruppen im Raum, unterscheiden. Die eine Form ist das Spiegelbild der anderen und sie können nicht durch Drehen und Wenden zur Deckung gebracht werden (Zeeck et al. 1997, Wiesehan 2003). Um nun ein D-Peptid zu gewinnen, verwendetet man das Mirror-image Phage Display, eine Abwandlung des Phage Displays. Dabei wird nicht das natürlich vorkommende L-Target verwendet, sondern sein D-Enantiomer (D-Target) an einer Matrix fixiert. Durch Phage Display wird ein spezifisch an das D-Target bindende L-Peptid selektiert. Da sich Enantiomer wie Bild und Spiegelbild verhalten, geht man davon aus, dass die Bindung zwischen selektierten L-Peptid und D-Target die gleichen Eigenschaften aufweist, wie die Bindung zwischen L-Target und D-Petid.

D-Peptide können wie ihre Spiegelbilder mit Signalmolekülen gekoppelt werden und so in bildgebenden Verfahren erkannt werden (Schumacher et al. 1996, Wiesehan 2003) (Abb. 1).

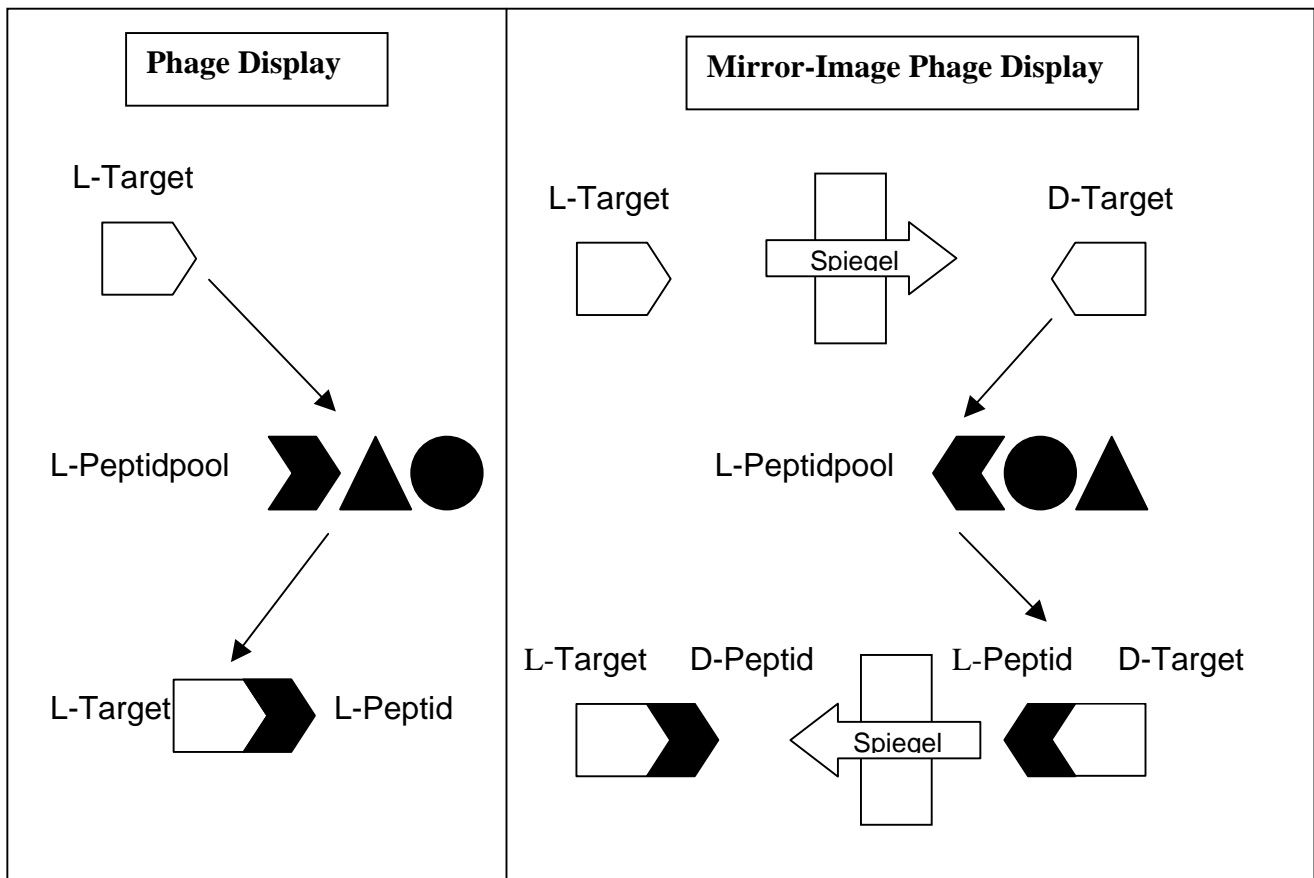


Abb. 1: Schema: a) Phage Display: Eine passende Sonde zu einem Zielmolekül (L-Target) wird selektiert, indem man zu festen Zielmolekülen Peptid-Bibliotheken tragende Phagen zugibt. Spezifisch an das Target bindende Peptide werden durch das Zielmolekül festgehalten, nicht-bindende später herausgewaschen. Die selektierten Peptide werden eluiert, sequenziert und weiter vermehrt. b) Mirror-Image Phage Display: Eine passende Sonde zu einem Zielmolekül (L-Target) wird selektiert, indem zum Phage Display anstatt des L-Targets sein D-Enantiomer (D-Target) an einer Matrix fixiert. Aus dem Peptidpool wird nun durch Phage Display ein dazu passendes L-Peptid selektiert. Da sich Enantiomer wie Bild und Spiegelbild verhalten, geht man davon aus, dass die Bindung zwischen selektierten L-Peptid und D-Target die gleichen Eigenschaften aufweist, wie die Bindung zwischen L-Target und D-Peptid.

Einem Forscherteam in Jülich ist es gelungen ein D-Peptid zu gewinnen, das spezifisch an das β A4 -Amyloid-Protein bindet. Doch bisher konnte eine Darstellung der Alzheimerplaques mit diesem D-Peptid nur lichtmikroskopisch in vitro erfolgen (Wiesehan et al. 2003). In dieser Studie soll nun eine vollständige fluorochrome Sonde konzipiert werden, die Alzheimerplaques in vivo unter Verwendung dieses spezifisch bindenden Proteins darstellen kann. Um β A4-Protein in vivo nachzuweisen muss überprüft werden, ob sich die beiden Komponenten D-Peptid und Cy5.5 koppeln (one-step fluorochrome Sonde) und in einem Prototyp-Fluoreszenzdetektor darstellen lassen. Alternativ dazu ist es sinnvoll deren Eignung

als fluorochrome Sonde zum Nachweis des β A4-Proteins auch in einem Zweischnittverfahren zu testen. Dabei werden die beiden Komponenten D-Peptid und Cy5.5 durch Brückenmoleküle miteinander verbunden (two-step fluorochrome Sonde). Biotin und Streptavidin sind solche Brückenmoleküle. Die beiden Moleküle weisen eine hohe Bindungsaffinität ($K_s = 10^{-15}$ M) zueinander auf und wurden bereits zur Tumordarstellung mit Antikörpern in vivo angewandt (Grana et al. 1996). Ein Verfahren zum Nachweis von Amyloid-Plaques mit der Biotin-Streptavidin-Methode ist bisher nicht bekannt.

Eine Detektion von alzheimerspezifischen Ablagerungen unter in vivo Bedingungen mit einem D-Peptid ist in der Literatur zur Zeit noch nicht beschrieben. In dieser Studie werden deshalb die grundlegenden Parameter untersucht, die eine Bildgebung von senilen Plaques in vivo erst ermöglichen. Es muss eine Methode gefunden werden, Fluorochrom und D-Peptid stabil zu einer Sonde zu koppeln und die Vorteile einer one-step bzw. two-step fluorochromen Sonde zu erproben. Des Weiteren ist es notwendig die Sonden auf ihre Fähigkeit zur spezifischen Markierung von Alzheimerplaques zu untersuchen und ihre Darstellbarkeit im Prototyp-Fluoreszenzdetektor zu überprüfen. Dazu müssen auch die Grundeinstellungen des Detektors an die Sonde und deren Anwendung angepasst werden. Das Einschnittverfahren ist gegenüber dem Zweischnittverfahren wesentlich zeitaufwendiger. Deshalb wurde durch die Versuche mit der two-step fluorochromen Sonde auch getestet, ob eine Verbindung der beiden Komponenten D-Peptid und Fluoreszenzfarbstoff zu einer one-step Sonde zur Markierung des β -Amyloids sinnvoll ist.

Um unter Berücksichtigung der oben genannten Gründe eine ideale Bildgebung von senilen Plaques zu erreichen, wurden in der vorliegenden Studie diese Gesichtspunkte bearbeitet:

1. Erprobung einer two-step fluorochromen Sonde an Hirngewebsschnitten von Alzheimerpatienten
2. Konzeption und Erprobung einer one-step fluorochromen Sonde zur Detektion von Alzheimerplaques

3. Erprobung definierter Rahmenbedingungen für die spezielle Detektion eines Modellfluorochroms als möglicher Bestandteil einer fluorochromen Sonde in Phantomen: Überprüfung des Einflusses von Hirngewebe und Schädelkalotte auf die Fluoreszenzintensitäten des Modellfluorochroms (Eindringtiefe) anhand von Hirngewebsschnitten, Gehirnphantomen in präparierten Mäuseschädeln und von in situ Applikation des Fluorochroms in Gehirne von abgetöteten Mäusen. Erprobung ausgewählter Fluorochromkonzentrationen und Festlegung geeigneter Laserstärken des Prototyp-Ganzkörper-Fluoreszenzdetektors.

3 Materialien und Methoden

3.1 Messungen mit dem Small Animal Near Infrared Fluorescence Imager (SANIRF) und deren statistische Auswertung

Der Prototyp-Ganzkörper-Fluoreszenzdetektor, der Small Animal Near Infrared Fluorescence Imager (SANIRF) wurde zur Bildgebung von Fluoreszenzintensitäten in Kleintieren (Mäusen) konzipiert und für den Farbstoff Cy5.5 (Amersham Bioscience Pharmatech) optimiert. Er war aber auch geeignet Zellen und Gewebspräparate, die mit diesem Fluoreszenzfarbstoff behandelt wurden, zu vermessen. Das schwarze Gehäuse des SANIRF-Imagers war licht- und laserdicht. Das Gerät verfügte über eine Wanne, in der die Versuchsobjekte platziert werden konnten. Des Weiteren war ein Diodenlaser installiert, durch den eine Anregung des Farbstoffes bei einer Wellenlänge von 675 nm erfolgte, sowie eine digitale CCD-Kamera zur Aufnahme der Emissionswellenlänge von 695 nm, die zuvor von einem Interferenzfilter für 708,5 nm selektiert wurde. Der Diodenlaser wurde mittels eines Fußschalters ein- und ausgeschaltet (Abb. 2).



Abb. 2: Darstellung des SANIRF mit lichtundurchlässigem Gehäuse, CCD-Kamera, Diodenlaser und Messcomputer.

Für die Messungen wurden die untersuchten Objekte mit Hilfe eines Pilotstrahles, der den Anregungsbereich des Diodenlasers ausleuchtete, im SANIRF-Imager platziert. Dies geschah, um eine vollständige und gleichmäßige Ausleuchtung des Untersuchungsmaterials zu garantieren. Um die Aufnahmen später besser auswerten zu können wurden vor jeder Messung Nativaufnahmen (Aufnahmen bei Tageslicht und *ohne* Laseranregung) des

jeweiligen Objektes angefertigt. Danach wurden die entsprechenden Fluoreszenzmessungen durchgeführt. Dazu konnten Laserleistungen von 0,01 W bis 1,0 W gewählt werden.

Als Standardbedingungen wurden folgende Messparameter festgelegt:

<u>Belichtungszeit:</u>	2 sec
<u>Helligkeit:</u>	0
<u>Kontrast:</u>	0
<u>Kamerahöhe:</u>	42 cm

Zur Auswertung wurden die jeweiligen Messbereiche, die sogenannten Regions of interest (ROIs), anhand der Nativaufnahmen festgelegt und dann auf die NIR-Fluoreszenzbilder nach Laseranregung transferiert. Das Computerprogramm Syngo (Siemens Medical Solutions, Erlangen, Deutschland) erfasst innerhalb der ROIs jeden einzelnen Bildpunkt (Pixel) und errechnet daraus bereits einen Mittelwert der Fluoreszenzintensität mit zugehöriger Standardabweichung. Der Mittelwert der Fluoreszenzintensität der untersuchten Objekte, die der gleichen Behandlungsart unterzogen wurden, musste deshalb aus den Mittelwerten der ROIs der einzelnen Objekte errechnet werden. Um nun dieser Situation gerecht zu werden und sowohl die intra- als auch die interspezifischen Schwankungen zu berücksichtigen, wurde eine statistische Formel zur Berechnung des Mittelwertes aus Mittelwerten einzelner Fluoreszenzmessungen bei ungleichen Varianzen verwendet. Diese lautet wie folgt:

$$\bar{x} = \frac{(n_1 * \bar{x}_1 / s_1^2) + (n_2 * \bar{x}_2 / s_2^2) + \dots + (n_k * \bar{x}_k / s_k^2)}{(n_1 / s_1^2) + (n_2 / s_2^2) + \dots + (n_k / s_k^2)} \quad (1)$$

Dabei sind:

n= Anzahl der Stichproben pro Versuchsreihe (Pixelzahl der ausgemessenen ROIs)

x= Mittelwerte der Stichproben der Versuchsreihen (Mittelwerte der ausgemessenen ROIs)

s= Standardabweichungen der Stichproben der Versuchsreihe (Standardabweichung der ausgemessenen ROIs)

Um ebenfalls die intra- und interspezifischen Schwankungen zu berücksichtigen wurde auch die Standardabweichung nach folgender Formel berechnet:

$$s = \sqrt{\frac{(n_1 - 1) * s_1^2 + (n_2 - 1) * s_2^2 + \dots + (n_k - 1) * s_k^2}{n - k}} \quad (2)$$

Dabei sind:

n= Anzahl der Stichproben pro Versuchsreihe (Pixelzahl der ausgemessenen ROIs)

s= Standardabweichungen der Stichproben der Versuchsreihen (Standardabweichung der ausgemessenen ROIs)

Um zu überprüfen, ob sich zwei Mittelwerte signifikant voneinander unterscheiden, wurde ein zweiseitiger t-Test für den Vergleich zweier Mittelwerte bei ungleichen Varianzen durchgeführt.

3.2 Beschreibung des verwendeten D-Peptids

Das verwendete Peptid besteht aus 12 Aminosäuren bei einem Molekulargewicht von 1,75 kD. Die genaue Sequenz kann aufgrund eines vorliegenden Patentes nicht aufgezeigt werden. Das Peptid bindet spezifisch an das β -A4-Protein, welches bei Patienten mit Morbus Alzheimer im Gehirn abgelagert wird. Das vorliegende Peptid wurde mittels Mirror Phage Display von einer Partnergruppe in Jülich hergestellt. Das hat den Vorteil, dass es von körpereigenen Proteasen nicht erkannt und abgebaut werden kann. Außerdem wirkt es weniger immunogen als sein L-Enantiomer. Das D-Peptid wurde in der vorliegenden Studie Erstens als Bestandteil einer one-step fluorochromen Sonde, spezifisch bindendes Substrat und optisch aktiver Ligand werden gekoppelt, verwendet. Zweitens fungierte das D-Peptid als Bestandteil einer two-step fluorochromen Sonde, Substrat und Ligand werden getrennt voneinander verabreicht und durch Brückenmoleküle während der Behandlung miteinander verbunden.

3.3 Beschreibung des verwendeten Cyaninfarbstoffes (Cy5.5)

Cy5.5 ist ein monofunktionaler Cyaninfarbstoff der Firma Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland. Er lässt sich im basischen Milieu (pH 9,3) leicht an Proteine koppeln; Absorptionsmaximum (675 nm) und Emissionsmaximum (694 nm) liegen im Nah-Infrarot-Bereich des Spektrums.

3.4 Erprobung einer two-step fluorochromen Sonde an Hirngewebsschnitten von Alzheimerpatienten

3.4.1 Arbeitsutensilien

3.4.1.1 Chemikalien

- APAAP-Komplex (APAAP-Kit, DAKO, Glostrup, Dänemark)
- Aqua dest. (Ampuwa, Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg, Deutschland)
- BSA (Fluka Biochemika AG, Neu-Ulm, Deutschland)
- Cy5.0-Sreptavidin (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland)
- D- β A4-Peptid (Prof. Willbold, Forschungszentrum Jülich, Jülich, Deutschland)
- Ethanol 96% (Euro-Alkohol-Vertriebsgesellschaft mbH, Nordhausen, Deutschland)
- KCL (Aldrich-Chemie GmbH und Co. KG, Steinheim, Deutschland)
- KH_2PO_4 (Aldrich-Chemie GmbH und Co. KG, Steinheim, Deutschland)
- Mayer's Hämatoxylin (Institut für Pathologie, FSU Jena, Jena, Deutschland)
- Na_2HPO_4 (Aldrich-Chemie GmbH und Co. KG, Steinheim, Deutschland)
- NaCl (Aldrich-Chemie GmbH und Co. KG, Steinheim, Deutschland)
- Naphthol-AS-BI-Phosphat/Neufuchsin (Institut für Pathologie, FSU Jena, Jena, Deutschland)
- Permafluor (Aqueous Mounting Medium, Immunotech Coulter Company, Marseille, Frankreich)
- Rotihistol (6640I, Carl Roth GmbH und Co., Karlsruhe, Deutschland)
- Urea (Aldrich-Chemie GmbH und Co. KG, Steinheim, Deutschland)
- Verdünnungspuffer für APAAP-Komplex (APAAP-Kit, DAKO, Glostrup, Dänemark)

3.4.1.2 Lösungen

- 8M Urea: 4,8 g Urea in 10 ml 1-fachem PBS.
- Blockpuffer (3%ig): 300 mg biotinfreies BSA (Fluka Biochemika AG, Neu-Ulm, Deutschland) in 10 ml Aqua dest..
- Cy5.0-Streptavidinlösung (1:200): 0,75 μ M Cy5.0-Streptavidin in Blockpuffer (3%ig)
- D-Peptidlösung (500 μ M): 500 μ M D-Peptid in 3%igen Blockpuffer.
- Entwicklerlösung: 0,25 mmol Levamisol (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland)
- Kaninchen-anti-Maus-Serum: Kaninchen-anti-Maus-Serum (DAKO, Glostrup, Dänemark) 1:70 in Verdünnungspuffer für APAAP-Komplex
- PBS (1x, pH 7,4): PBS Stammlösung in Aqua dest. 1:10 verdünnen.
- PBS Stammlösung (10x, pH 7,4): 0,2% KCL, 8% NaCl, 0,2% KH_2PO_4 und 1,15% Na_2HPO_4 in Aqua dest..
- Primärantikörper: Anti-beta amyloid (Clone 6F3D, DAKO, Glostrup, Dänemark) 1:100 in TBS.
- TBS (pH 7,6): 0,05 M Tris/HCL und 0,15 M NaCl in Aqua dest.

3.4.1.3 Materialien

- Alzheimerhirngewebsschnitte (human, 5 μ m, 20 μ m, 100 μ m, Parietal-, Frontal- und Temporallappen (Hippocampus), Pathologie der FSU Jena, Jena, Deutschland)
- Nicht-Alzheimerhirngewebsschnitte (human, 5 μ m, 20 μ m, 100 μ m, Okzipitallappen, Pathologie der FSU Jena, Jena, Deutschland)
- Crushed Ice (Forschungszentrum Lobeda, Jena, Deutschland)
- Deckgläser (24*50 mm, Menzel-Gläser, Braunschweig, Deutschland)
- Eppendorfcups (1,5 ml, Eppendorf, Köln, Deutschland)
- Objektträger (76*26 mm) (Menzel-Gläser, Braunschweig, Deutschland)
- Wachsstift (PAP-Pen, Immunotech Coulter Company, Marseille, Frankreich)
- Pasteurpipetten (D810. John Poulten LTD, Essex, England)
- Pipettenspitzen (300 μ l, Eppendorf, Köln, Deutschland)

- Zentrifugenröhrchen (15 und 50 ml, Greiner Bio-One GmbH, Solingen, Deutschland)

3.4.1.4 Geräte

- Akkujet (Brand, Wertheim, Deutschland)
- Laserscanningmikroskop (LSM-510)
- Magnetrührer (IKA Labortechnik, Janke und Kunkel GmbH und CoKG, Staufen, Deutschland)
- Messsoftware (Syngo, Siemens Medical Solutions, Erlangen, Deutschland)
- Pipettierhilfe (50µl, 100µl, 200µl, Eppendorf, Köln, Deutschland)
- Präzisionswaage (AC 211 P, Sartorius AG, Göttingen, Deutschland)
- Schüttler (Unimax 2010, Heidolph, Schwalbach, Deutschland)
- Prototyp-Ganzkörper-Fluoreszenzdetektor (Small Animal Near Infrared Fluorescence Imager, Siemens Medical Solutions, Erlangen, Deutschland)

3.4.2 Nachweis der optischen Detektierbarkeit der two-step fluorochromen Sonde nach Behandlung von humanen Alzheimerhirnschnitten

3.4.2.1 Vorbereitung

Für diese Färbung von Hirnschnitten wurde eine two-step Sonde verwendet. Das ist eine Sonde, bei der in einem Zweischnittverfahren die Inkubation zuerst mit dem spezifisch bindenden Substrat und erst dann mit dem optisch aktiven Liganden erfolgt. Alle Schritte dieser Färbung wurden in einer feuchten Kammer durchgeführt. Dazu wurden in einem verschließbaren, lichtundurchlässigen Styroporkarton angefeuchtete Papierhandtücher ausgelegt. Über den Papierhandtüchern wurden nebeneinander zwei Pasteurpipetten positioniert. Diese dienten später als Haltevorrichtung für die Hirnschnitte. Der gesamte Karton wurde auf einem Schüttler befestigt, so dass die Hirnschnitte während der Färbung geschwenkt werden konnten.

Alle Lösungen wurden frisch am Tag der Färbung hergestellt.

3.4.2.2 Entparaffinierung der Hirnschnitte

Ein Teil der erhaltenen Hirnschnitte war in Paraffin eingebettet. Um diese anfärben zu können, musste vorher eine Entparaffinierung vorgenommen werden. Dazu wurde von den nachfolgend beschriebenen Lösungen ca. 0,5 ml auf ein Präparat pipettiert, so dass der Schnitt vollständig bedeckt war. Die Objektträger wurden dann auf den Pasteurpipetten in der feuchten Kammer positioniert. Nach jedem Schritt entfernte man die Flüssigkeit durch Abklopfen von dem Hirnschnitt. Die Entparaffinierung erfolgte je nach Schnittstärke nach dem in Tabelle 1 dargestellten Schema.

Tab. 1: Schema zur Entparaffinierung von Hirnschnitten als Vorbereitung zum Nachweis des β A4-Proteins mittels einer two-step fluorchromen Sonde in humanen Alzheimerhirngewebsproben in einem Prototyp-Ganzkörper-Fluoreszenz-Detektor am Beispiel eines 5 μ m Hirnschnittes. Aufgeführt sind die verwendeten Lösungen pro Arbeitsschritt und die Behandlungszeiten.

Schritt	Lösung	Zeit
1	Rotihistol	2x3 min
2	Ethanol 96%	4x3 min
3	PBS	1x1 min

3.4.2.3 Behandlung der Hirnschnitte mit 8M Urea

Dieser Vorgang diente der Verstärkung der L-Peptidpräsentation. Dazu wurden die Schnitte als Erstes mit einem Wachsstift umrundet, um ein Auslaufen der Flüssigkeit zu verhindern. Das Auftragen und Verwerfen der Lösungen erfolgte wie bereits in 3.4.2.2 beschrieben. Die Behandlung der Hirnschnitte mit 8M Urea erfolgte nach dem in Tabelle 2 dargestellten Schema.

Tab. 2: Schema zur Behandlung von Hirnschnitten mit 8M Urea als Vorbereitung zum Nachweis des β A4-Proteins mittels einer two-step fluorchromen Sonde in humanen Alzheimerhirngewebsproben in einem Prototyp-Ganzkörper-Fluoreszenz-Detektor am Beispiel eines 5 μ m Hirnschnittes. Aufgeführt sind die verwendeten Lösungen pro Arbeitsschritt und die Behandlungszeiten.

Schritt	Lösung	Zeit
1	8M Urea in PBS	1x10 min
2	PBS	4x5 min

3.4.2.4 Färbevorgang zur optischen Detektierbarkeit der two-step fluorochromen Sonde in Alzheimerhirnschnitten

Gefärbt wurden humane Alzheimer Hirnschnitte aus dem Hippocampus und der Großhirnrinde. Als Negativkontrollen dienten Tumorschnitte und Hirngewebe aus dem okzipitalen Cortex eines Nicht-Alzheimerpatienten. Diese lagen als Cryostatschnitte, Paraffinschnitte und konserviert in Formalin vor. Als Kontrolle zu den gefärbten Alzheimerschnitten wurden die aufgeführten Gewebsschnitte auch nur mit dem Cy-Farbstoff bzw. nur mit Blocklösung behandelt.

Während der Färbung wurde darauf geachtet, dass die Kammer immer lichtundurchlässig verschlossen war, um einen Verlust der Fluoreszenzintensitäten des Cy-Farbstoffes durch Licht zu verhindern. Verwendet wurde das D-Peptid im biotinylierten Zustand, zu dem in einem zweiten Schritt der an Streptavidin gekoppelte Cy5.5-Fluoreszenzfarbstoff gegeben wurde.

Um ein Fluoreszenz-Signal der fluorochromen Sonde im SANIRF-Imager zu detektieren wurde bei der Hirngewebstdicke zwischen 5 μm und 100 μm variiert. Um diese Schnitte anfärben zu können mussten die Färbezeiten den Schichtdicken angepasst werden. Dazu wurden die Behandlungszeiten, ausgehend von einem 5 μm Hirnschnitt, mit dem Faktor der Zunahme der Gewebeschichtdicke multipliziert. Verändert wurden auch die D-Peptid-Konzentration zwischen 5 μM und 500 μM sowie die Konzentration des Cy5.0-Streptavidin zwischen 1:400 und 1:50. Hirngewebsschnitte von 100 μm konnten nicht mehr auf einem Objektträger fixiert werden und wurden deshalb schwimmend in Eppendorfcups inkubiert.

Die Färbung der Hirnschnitte erfolgte nach dem in Tabelle 3 dargestellten Schema.

Tab. 3: Schema zur Färbung von Hirnschnitten zum Nachweis des β A4-Proteins mittels einer two-step fluorchromen Sonde in humanen Alzheimerhirngewebsproben in einem Prototyp-Ganzkörper-Fluoreszenz-Detektor am Beispiel eines 100 μ m Hirnschnittes. Aufgeführt sind die verwendeten Lösungen pro Arbeitsschritt und die Behandlungszeiten.

Schritt	Lösungen	Zeit
1	Blocklösung 3%ig	1x6 h 40 min
2	Biotinyliertes D-Peptid in Blocklösung 500 μ M	1x20 h
3	PBS	4x1 h 40 min
4	Cy5.0-Streptavidin in Blocklösung 0,75 μ M	1x2 h 40 min
5	PBS	4x1 h 40 min

Nach der Färbung wurden die 5 μ m und 20 μ m Schnitte mit Permafluor (Aqueous Mounting Medium) eingedeckt. Die 100 μ m Schnitte wurden schwimmend in PBS aufbewahrt und bis zur Auswertung bei 4°C gelagert.

3.4.2.5 Darstellung der two-step fluorchromen Sonde im SANIRF

Die Objektträger wurden mit Hilfe eines Pilotstrahles, einem Lichtstrahl, der den Wirkungsbereich des Laserstrahles optisch markiert, im SANIRF platziert. Die Messungen erfolgten unter Standardbedingungen bei 0,6 W und 1,0 W. Die Auswertung der Aufnahmen erfolgte am Computer mit dem Messprogramm Syngo. Hirnschnitte von 100 μ m wurden vorsichtig mit einer Pipette aus den Eppendorfcups entnommen und einzeln auf einem Objektträger ausgebreitet. Die Präparate wurden mit PBS feucht gehalten.

3.4.2.6 Alternativer Nachweis von Alzheimerplaques in den verwendeten Hirngewebschnitten

Eine Verifikation der Anwesenheit von β A4-Plaques in den Hirnschnitten erfolgte durch konventionelle immunhistologische Methoden. Dazu wurden Proben aus der gleichen

Hirnregion des identischen Patienten (3.4.2.4) auf herkömmliche Weise histologisch gefärbt. Dieser Nachweis wurde in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. med. habil. Patt, Neuropathologisches Institut der FSU Jena, erbracht. Dazu wurden die Alzheimerhirngewebsschnitte (5 µm) entparaffiniert. Die Detektion der Plaques wurde mit dem APAAP-Kit (DAKO, Glostrup, Dänemark) gemäß der Empfehlungen des Herstellers durchgeführt. Nach Inkubation der Alzheimerhirnschnitte mit dem entsprechenden Primärantikörper Anti-beta amyloid (Clone 6F3D, DAKO, Glostrup, Dänemark) über Nacht bei 4°C erfolgte eine Behandlung mit einem Kaninchen-anti-Maus-Serum (Verdünnung 1:70 in Puffer für APAAP-Komplex, DAKO, Glostrup, Dänemark) für 45 min bei Raumtemperatur (RT). Die Schritte Kaninchen-anti-Maus-Serum und APAAP-Komplex wurden zur Steigerung der Sensitivität der Methode zweimal wiederholt. Zwischen allen Inkubationen wurden die Hirnschnitte gründlich in Tris-gepufferter Kochsalzlösung (TBS) gespült. Der Nachweis gebundener alkalischer Phosphatase erfolgte mittels Naphthol-AS-BI-Phosphat/Neufuchsin unter lichtmikroskopischer Kontrolle. Zur Blockierung der endogenen Enzymaktivität wurde der Entwicklerlösung 0,25 mol Levamisol (Sigma, USA) zugesetzt.

Abschließend wurden die Zellkerne noch in Mayer's Hämatoxylin für eine Minute gefärbt, mit aufsteigenden Alkohollösungen dehydriert und permanent mit Glycerol/Gelatine eingedeckt.

3.5 Konzeption und Erprobung einer one-step fluorochromen Sonde zur Detektion von Alzheimerplaques im SANIRF-Imager

3.5.1 Arbeitsutensilien

3.5.1.1 Chemikalien

- Acetonitril (RdH Laborchemikalien GmbH und Co. KG, Jeetze, Deutschland)
- Aqua dest. (Ampuwa, Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg, Deutschland)
- BSA (Fluka Biochemika AG, Neu-Ulm, Deutschland)
- Coupling buffer (Cy5.5 labelling Kit PA 35500 für 0,5 bis 1,5 mg Protein, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland)

- Cy5.0-Streptavidin (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland)
- Cy5.5 (Monofunctional, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland)
- D-βA4-Peptid (Prof. Willbold, Forschungszentrum Jülich, Jülich, Deutschland)
- PBS (Gibco, Karlsruhe, Deutschland)
- TFA (RdH Laborchemikalien GmbH und CoKG, Jeetze, Deutschland)

3.5.1.2 Lösungen

- Blockpuffer (3%ig): 3% biotinfreies BSA in Aqua dest.
- Cy5.0-Streptavidinlösung (1:200): 0,75 µM Cy5.0-Streptavidin in 3%igem Blockpuffer
- D-Peptidlösung (50 µM): 50 µM D-Peptid in 3%igem Blockpuffer
- Fluorochrome Sonde (50 µM): 50 µM fluorochrome Sonde in 3%igem Blockpuffer
- Lösung A: H_2O + 0,1% TFA
- Lösung B: 80% ACN + 0,1% TFA
- PBS (1x, pH 7,4): PBS Stammlösung in Aqua dest. 1:9 verdünnen
- PBS Stammlösung (10x, pH 7,4): 0,2% KCL, 8% NaCl, 0,2% KH_2PO_4 und 1,15% Na_2HPO_4 in Aqua dest.

3.5.1.3 Materialien

- Alufolie (PAPSTAR Vertriebsgesellschaft GmbH, Kall, Deutschland)
- Alzheimerhirngewebsschnitte (human, 5 µm, 20 µm, 100 µm, Parietal-, Frontal- und Temporallappen (Hippocampus), Pathologie der FSU Jena, Jena, Deutschland)
- Nicht-Alzheimerhirngewebsschnitte (human, 5 µm, 20 µm, 100µm, Okzipitallappen, Pathologie der FSU Jena, Jena, Deutschland)
- Bechergläser (10 bis 250 ml, Schott, Mainz, Deutschland)
- Crushed Ice (Forschungszentrum Lobeda, Jena, Deutschland)
- Eppendorfcups (1,5 ml, 2 ml, Eppendorf, Köln, Deutschland)
- HPLC-Probengefäß (Hewlett Packard, Wallbronn, Deutschland)
- HPLC-Säule (Vydac 218 TP 54, MZ-Analysentechnik GmbH, Mainz, Deutschland)

- Präzisionsküvette (6040-UV, Hellma GmbH und Co. KG, Mühlheim/Baden, Deutschland)
- Objektträger (76*26 mm, Menzel-Gläser, Braunschweig, Deutschland)
- Pipettenspitzen (300 µl, 1000 µl, Eppendorf, Köln, Deutschland)
- Zentrifugenröhrchen (15 ml und 50 ml, Greiner Bio-One GmbH, Solingen, Deutschland)

3.5.1.4 Geräte

- Akkujet (Brand, Wertheim, Deutschland)
- HPLC-Meßgerät (Hewlett Packard, Wallbronn, Deutschland)
- Magnetrührer (IKA Labortechnik, Janke und Kunkel GmbH und Co. KG, Staufen, Deutschland)
- Messsoftware (Syngo, Siemens Medical Solutions, Erlangen, Deutschland)
- Pipettierhilfe (50µl, 100µl, 200µl, Eppendorf, Köln, Deutschland)
- Präzisionswaage (AC 211 P, Sartorius AG, Göttingen, Deutschland)
- Schüttler (Unimax 2010, Heidolph, Schwalbach, Deutschland)
- Prototyp-Ganzkörper-Fluoreszenzdetektor (Small Animal Near Infrared Fluorescence Imager, Siemens Medical Solutions, Erlangen, Deutschland)
- Spectrofluorometer (F8-6200, Jasco, Gotha, Deutschland)
- Vakuumzentrifuge (Savant DNA Speed Vac 110, Global Medical Instrumentation INC., Abertville, MN, USA)
- Vortex (Scientific Industries, INC., Bohemia, NY, USA)

3.5.2 Kopplung des Cy5.5-Fluoreszenzfarbstoffes an das D-Peptid

Zur Herstellung der fluorochromen Sonde wurden 1 mg D-Peptid in 1 ml PBS gelöst und mit 50 ml coupling buffer (pH 9,3, Cy5.5 Kit, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland) vermischt. Danach wurde die Peptidlösung 10 mal kurz gevortext und in ein Reagenzgefäß mit 150 nmolen Cy5.5 überführt. Das Peptid-Farbstoff-Gemisch wurde daraufhin für 30 min inkubiert und währenddessen alle 10 min erneut gevortext. Anschließend wurde die Flüssigkeit 2 h durch Vakuumkonzentration aufkonzentriert um ein

gewünschtes Endvolumen von 120 µl zu erreichen. Dies war notwendig, da bei einer späteren Auftrennung des Gemisches mit HPLC nur ein Flüssigkeitsvolumen von 120 µl bearbeitet werden konnte.

3.5.3 Gewinnung der one-step fluorochromen Sonde durch Hochdruckflüssigkeits-Chromatographie (HPLC)

Diese Methode diente der Trennung des fluorochrom-markierten D-Peptids (one-step fluorochromen Sonde) von freiem Farbstoff und freiem D-Peptid im Gemisch aus 3.5.2.. Eine one-step Sonde ist eine Sonde, bei der das spezifisch bindende Substrat mit dem optisch aktiven Liganden direkt gekoppelt wird und somit eine Inkubation in einem Einschrittverfahren erfolgen kann.

Dieser Versuch wurde in Zusammenarbeit mit Dr. Hoppe (Institut für Biochemie II, FSU Jena) durchgeführt. Durch ihn wurden das Gerät und die Säule vorbereitet. Es wurden folgende Parameter für die Trennung festgelegt:

<u>Injektionsvolumen:</u>	100 µl
<u>Akquisitionsmethode:</u>	5-60% Lösung B in 30 min
<u>Pumpe A Lösung A:</u>	H ₂ O + 0,1% TFA
<u>Pumpe B Lösung B:</u>	80% ACN + 0,1% TFA
<u>Flussrate:</u>	1 ml/min

120 µl der D-Peptid-Cy5.5-Lösung aus 3.5.2 wurden blasenfrei in ein HPLC-Probengläschen pipettiert. Das Probengefäß wurde in dem Chromatographen platziert und die HPLC gestartet. Die Auftrennung konnte anhand von Peaks unterschiedlicher Absorption (in bE) bei einer Wellenlänge von 280 nm auf einem Computermonitor verfolgt werden. Bei jedem erkennbar signifikanten Anstieg der Intensität wurde bis zum Erreichen des Nullniveaus bzw. bei einem erneuten Anstieg das Eluat in einem Eppendorfcup aufgefangen. Eluate ohne signifikanten Anstieg der Absorption wurden in ein Becherglas abgeleitet und verworfen. Die aufgefangenen Proben wurden lichtdicht verpackt und bei 4°C gelagert.

3.5.4 Charakterisierung der in der HPLC gewonnenen Eluate mittels Spectrometrie

Die Spectrometrie diente dazu die in 3.5.3 gewonnenen Eluate näher zu charakterisieren um festzustellen, ob die fluorochrome Sonde erfolgreich separiert werden konnte und ob eine Kopplung zwischen Cy5.5-Fluoreszenzfarbstoff und D-Peptid stattgefunden hat.

Dazu wurden jeweils 1 ml der in 3.5.3. gewonnenen Eluate in eine Messküvette pipettiert und unter folgenden Bedingungen im Spectrofluorometer gemessen:

<u>Band width (Ex.):</u>	5 nm	<u>Measurement range:</u>	450-900 nm
<u>Band width (Em.):</u>	5 nm	<u>Excitation wavelength:</u>	649 nm

Einige Eluate wurden aufgrund hoher Fluoreszenzintensitäten noch um den Faktor 1:10 mit PBS verdünnt. Unter den gleichen Bedingungen und bei gleichem Messvolumen wurden noch einige Kontrollen untersucht. So dienten 15 nmole Cy5.5 gelöst in Aqua dest. als Positivkontrolle. Als Negativkontrollen wurden Aqua dest. und Acetonitril gemessen. Die Menge an Acetonitril entsprach dem prozentualen Anteil in der Eluationslösung des zu vergleichenden Eluates. Die Auswertung der Messergebnisse erfolgte am Computer.

3.5.5 Markierung des β A4-Proteins mit der konzipierten one-step fluorochromen Sonde

Die Markierung der Alzheimerplaques mit der one-step fluorochromen Sonde erfolgte wie die bereits beschriebene Methode mit der two-step fluorochromen Sonde (3.4.2.4). Gefärbt wurden 100 μ m Hirngewebsschnitte.

Tab. 4: Schema zur Färbung von Hirnschnitten zum Nachweis des β A4-Proteins mittels einer one-step fluorochromen Sonde in humanen Alzheimerhirngewebsproben in einem Prototyp-Ganzkörper-Fluoreszenz-Detektor am Beispiel eines 100 μ m Hirnschnittes. Aufgeführt sind die verwendeten Lösungen pro Arbeitsschritt und die Behandlungszeiten.

Schritt	Lösungen	Zeit
1	PBS	4x1h 40 min
2	Blocklösung 3%ig	1x6h 40 min
3	Fluorochrome Sonde 50 μ M	1x20 h
4	PBS	4x1h 40 min

Als Vergleich wurde neben den Alzheimerhirnschnitten auch Gewebe eines pathologisch unauffälligen Patienten inkubiert. Alternativ wurden beide Hirngewebsproben mit der beschriebenen two-step fluorochromen Sonde (biotinyliertes D-Peptid (50 μ M), Cy5.0-Steptavidin (Verdünnung 1:200 in Blocklösung) bzw. nur mit Blocklösung behandelt.

3.6 Erprobung eines Modellfluorochroms an Phantomen

3.6.1 Arbeitsutensilien

3.6.1.1 Chemikalien

- Aqua dest. (Ampuwa, Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg, Deutschland)
- Cy5.5 (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland)
- Gelatine (gemahlen, RUF Lebensmittelwerk KG, Quakenbrück, Deutschland)
- PBS (Gibco, Karlsruhe, Deutschland)
- Physiologische Kochsalzlösung

3.6.1.2 *Materialien*

- Alufolie (PAPSTAR Vertriebsgesellschaft GmbH, Kall, Deutschland)
- Bechergläser (10 ml bis 250 ml, Schott, Mainz, Deutschland)
- Blitzkleber (Pattex, Henkel KGaA, Düsseldorf, Deutschland)
- Deckgläser (24*50mm, Menzel-Gläser, Braunschweig, Deutschland)
- Einmalküvetten (1,5 ml, 12,5*12,5*45 mm, Brand, Wertheim, Deutschland)
- Einmalrasierer (P.J. Dahlhausen und Co. KG, Köln, Deutschland)
- Einmalspritze (Omnifix®, Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland)
- Eppendorfcups (0,5 ml, Eppendorf, Köln, Deutschland)
- Küchenmesser
- Kanüle (Sterican 27G, Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland)
- Lineal (30 cm, Herlitz PBS AG, Berlin, Deutschland)
- Magnetrührstäbchen (VWL- International, Dresden, Deutschland)
- Objektträger (76*26 mm) (Menzel-Gläser, Braunschweig, Deutschland)
- Pflaster (Leukosilk®, Beiersdorf AG, Hamburg, Deutschland)
- Pipettenspitzen (300µl, Eppendorf, Köln, Deutschland)
- Plastikpipette (2 ml, Brand, Wertheim, Deutschland)
- Röntgenkassette (Kodak Min-R2 Cassette, Kodak, Stuttgart, Deutschland)
- Schere (Aesculap AG und Co. KG, Tuttlingen, Deutschland)
- Schweinehirn (Schlachthaus Jena, Jena, Deutschland)
- Spatel (Aesculap AG und Co. KG, Tuttlingen, Deutschland)
- Überraschungseier-Steckhülsen (Ferrero oHGmbH, Frankfurt/Main, Deutschland)

3.6.1.3 *Geräte*

- Akkujet (Brand, Wertheim, Deutschland)
- Betaaufnahme Röntgengerät (Mobilett II, Siemens, Berlin, Deutschland)
- Magnetrührer (IKA Labortechnik, Janke und Klunkel, Staufen, Deutschland)

- Messsoftware (Syngo, Siemens Medical Solutions, Erlangen, Deutschland)
- Pipettierhilfe (50µl, 100µl, 200µl, Eppendorf, Köln, Deutschland)
- Präparierbesteck (Aesculap AG und CoKg, Tuttlingen, Deutschland)
- Präzisionswaage (AC 211 P, Sartorius AG, Göttingen, Deutschland)
- Pürierstab (Promix silver plus, Krups GmbH, Solingen, Deutschland)
- Prototyp-Ganzkörper-Fluoreszenzdetektor (Small Animal Near Infrared Fluorescence Imager, Siemens Medical Solutions, Erlangen, Deutschland)

3.6.1.4 Versuchstiere

- Mäuse (BALB/c, Institut für Versuchstierkunde, Jena, Deutschland)
- Mäuse (C 57 BL 6, Institut für Versuchstierkunde, Jena, Deutschland)

3.6.2 Verhalten der detektierbaren Fluoreszenz des Modellfluorochroms in Abhängigkeit von der Gewebeschichtdicke

3.6.2.1 Vorbereitung

3.6.2.1.1 Zuschneiden des Schweinehirns

Gehirngewebe wurde in geeignete Stücke zugeschnitten. Dazu bearbeitete man Schweinehirn im gefrorenen Zustand. Mit einem Lineal wurden Schichtdicken von 1-5mm abgemessen und dann mit einem herkömmlichen Küchenmesser ein gerade Schnitte ausgeführt. Danach ist jede Hirngewebsscheibe noch auf 24x50 mm zugeschnitten worden, was der Größe eines Deckgläschens entspricht. Dann überprüfte man diese Hirnschnitte mittels einer Nadel auf ihre Schnittgenauigkeit, indem man die Nadel an verschiedenen Stellen einstach und dann die Eindringtiefe anhand des Lineals ablas. Dabei wurde eine mittlere Abweichung von etwa 0,2 mm festgestellt. Nach der Bearbeitung wurde das Gewebe bis zum Gebrauch wieder eingefroren.

3.6.2.1.2 Herstellung einer geeigneten Vorrichtung zur Messung der NIR-Fluoreszenz

Die Problematik dieses Versuches bestand darin, eine geeignete Messvorrichtung zu finden. Die Fluoreszenzintensitäten sollten durch das Hirngewebe hindurch gemessen werden, die Farbstofflösung durfte zur Vermeidung von Fehlern aber nicht in das Gewebe eindringen. Die ungewünschten Schichten, wie z.B. Luft, zwischen der Lösung und dem Hirnschnitt sollten möglichst gering gehalten werden. Auch war es wichtig, die einzelnen Farbstoffkonzentrationen in Behältern zu positionieren, die eine möglichst große Fläche, aber zur Einsparung des Fluoreszenzfarbstoffes ein möglichst geringes Volumen aufwiesen. Deshalb wurden aus ovalförmigen Plastikhüllen (Kinder-Überraschungseier, Ferrero oHGmbH, Frankfurt/Main, Deutschland) die Steckhülsen ausgeschnitten. Diese wurden mit Sekundenkleber auf Objektträger geklebt, so dass auf einem Objektträger vier und auf einem zweiten drei Steckhülsen befestigt waren. Das Fassungsvermögen der entstandenen Probengefäße betrug $150(\pm 10) \mu\text{l}$. Sie wurden nach dem Einfüllen der Proben mit einem Deckgläschen abgedeckt, auf dem dann die verschiedenen Hirnschnitte positioniert werden konnten (Abb. 3).

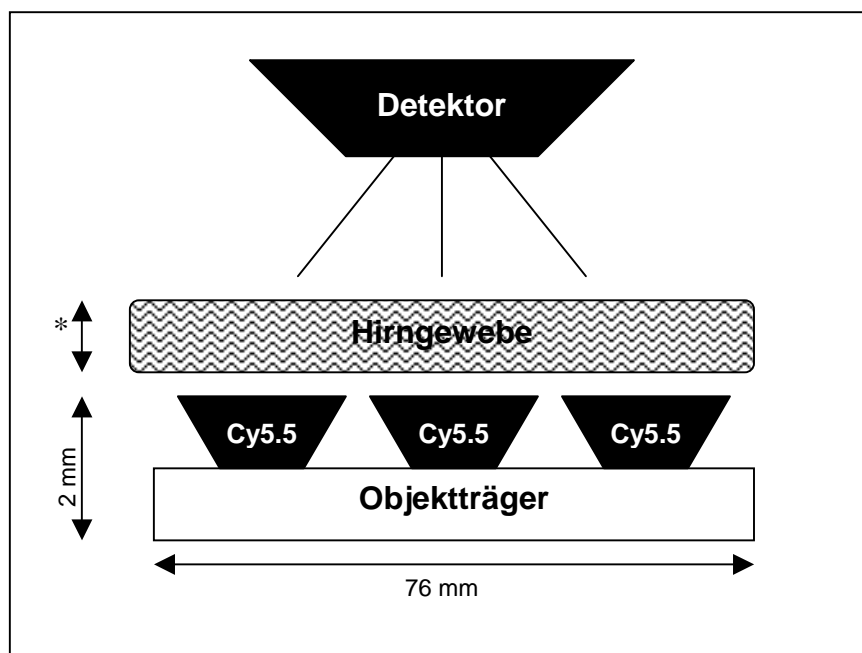


Abb. 3: Messvorrichtung zum Verhalten der detektierbaren Fluoreszenz des Modellfluorochroms in Abhängigkeit von der Hirngewebeschichtdicke. Die Messvorrichtung besteht aus einem Objektträger, auf den kleine Näpfe aufgeklebt wurden. Diese Näpfe konnten mit $150 \mu\text{l}$ einer Farbstofflösung (Cy5.5) befüllt und danach mit Hirngewebsschnitten abgedeckt werden. Messung des Objekts im Prototyp-Ganzkörper-Fluoreszenzdetektor. Pfeile: Größenangaben in mm. * = Hirngewebsdicken wahlweise 1-5 mm.

3.6.2.2 Messung der Fluoreszenzintensitäten des Modellfluorochroms Cy5.5 im SANIRF-Imager

Der Cy5.5 Fluoreszenzfarbstoff wurde in physiologischer Kochsalzlösung aufgelöst, so dass eine Ausgangslösung mit einer Menge von 15 nmolen Cy5.5 entstand. Diese wurde dann mit physiologischer Kochsalzlösung auf die gewünschten Mengen von 0,225 nmolen bis 1,8 nmolen verdünnt. In die Steckhülsen auf den Objektträgern wurden danach 150 µl der einzelnen Proben wie in Tabelle 5 beschrieben eingefüllt.

Tab. 5: Schema zur Befüllung von Probengefäßen (150µl) auf einer konstruierten Messvorrichtung zur Detektion von Fluoreszenzintensitäten durch Hirngewebe mit Angabe der enthaltenen Menge an Cy5.5-Fluoreszenzfarbstoff.

Probennummer	Verwendete Menge Cy5.5 in nmolen
1	Leer
2	NaCl
3	0,225
4	0,45
5	0,75
6	1,2

Die Objektträger wurden mit einem Deckglas abgedeckt, im SANIRF-Imager positioniert und die Fluoreszenzintensitäten von Cy5.5 unter Standardbedingungen bei Laserleistungen von 0,2W-1,0W gemessen. Die gleichen Messungen wurden wiederholt nach Bedeckung der Ansätze mit Hirngewebsschnitten von 1 mm bis 5 mm Dicke. Danach wurde mit Hilfe des Messprogrammes die Fluoreszenzintensität von Cy5.5 bei jeder Menge, jeder Hirngewebsschichtdicke und jeder Laserleistung (0,2 bis 1 W) ausgewertet.

3.6.3 In situ Detektierbarkeit der emittierten Fluoreszenz in Phantomen

3.6.3.1 Detektierbarkeit des Fluorochroms bei homogener Verteilung in Gehirphantomen

Für diesen Versuch wurde ca. 50 g Schweinehirn mit einem Pürierstab in eine homogene Masse überführt. Dann wurden 5 ml der Hirngewebsmasse mit 5 ml Gelatinelösung vermengt und jeweils 1 ml des Gemisches in eine Einmalküvette gefüllt. Hinzu wurde jeweils 100 µl Cy5.5-Farbstofflösung pipettiert und die Masse mit einem Magnetrührer gut vermengt.

Verwendet wurden Mengen von 0 bis 15 nmol Cy5.5, die in PBS gelöst waren. Die Küvetten mit der Hirnmasse wurden mit Alufolie lichtdicht verpackt und 24 h bei 4°C gekühlt, damit sich die Gelatine festigen konnte. Am nächsten Tag wurden die Gehirnphantome unter Standardbedingungen im Prototyp-Ganzkörper-Fluoreszenzdetektor bei Laserleistungen von 0,2 bis 1 W ausgemessen.

3.6.3.2 Abschwächung der Fluoreszenzintensitäten des Fluorochroms durch die Schädelkalotte

Dieser Versuch sollte eine Beeinflussung der Fluoreszenzintensität von Cy5.5 durch die Schädelkalotte einer Maus überprüfen.

Dazu wurden Mäuse (BALB/c, n= 9) mit Diethylether abgetötet und anschließend mit einer Schere dekapitiert. Mit einem Präparierbesteck wurden Haut und restliches Gewebe vorsichtig vom Schädelknochen getrennt. Durch das Foramen magnum wurde das Gehirn mit einer Pinzette und Papiertüchern entfernt. Zum Herauswaschen von Geweberesten und Blut wurden die Mäuseschädel für 48 h gewässert und, um die letzten Gewebereste zu lösen, für 20 min bei 100°C gekocht.

Die Herstellung der Gehirnphantome erfolgte wie in 3.6.3.1. beschrieben. Diese wurden allerdings, anstatt in Einmalküvetten, durch das Foramen magnum direkt in die Mäuseschädel appliziert. Verwendet wurden Mengen an Cy5.5 von 0 bis 2 nmol. Die Messung im SANIRF-Imager erfolgte ebenfalls unter Standardbedingungen.

3.6.4 Verhalten der Fluoreszenzintensitäten des Fluorochroms nach in situ Applikation in Mäusegehirne

3.6.4.1 Vorbereitung

Das Abtöten der Mäuse (Stamm C 57 BL 6, n=15) erfolgte mit Diethylether. Um eine höhere Bildschärfe im Prototyp-Ganzkörper-Fluoreszenzimager zu erreichen mussten die Mäuse an Kopf, Hals und Nacken rasiert werden. Dazu wurden für die Grobrasur eine Präparierschere und ein Langhaarschneider verwendet, für die Feinarbeiten eigneten sich Einmal- und ein Elektrorasierer. Danach wurden die Mäuse mit Pflaster auf einem Brett in Bauchlage fixiert.

Nächster Schritt war die Positionierung einer Kanüle im Gehirn. Dazu wurde pro Maus eine Einmalkanüle von außen auf das Tier gelegt, so dass die Spitze etwa auf der Mitte des Gehirns zu liegen kam. Daraufhin wurde anhand der Nadel die Einstichstelle abgemessen und auf dem Körper der Maus markiert. Die Eindringtiefe der Kanüle wurde ebenfalls gekennzeichnet. Dann wurde die Nadel an der Markierung eingestochen und waagrecht ins Gehirn bis zur Kennzeichnung vorgeschoben. Fixiert wurde die Kanüle mit einem Pflasterstreifen.

Anschließend wurde die Lage der Kanüle im Gehirngewebe mittels Röntgenaufnahme kontrolliert. Dazu wurden pro Maus zwei Bilder, je eines a.p. und seitlich, aufgenommen. Die Messparameter des Röntgengerätes wurden wie folgt festgelegt:

- 40,5 kV
- 5,6 mAs
- 70 cm Abstand zur Kassette

Die Aufnahmen wurden entwickelt und beurteilt. Gegebenenfalls wurde die Lage der Nadel korrigiert und mittels weiterer Röntgenaufnahmen überprüft. Positioniert wurde die Kanüle, gemessen vom Schädeldach, in der Transversalachse $0,6(\pm 0,1)$ mm ausgehend von links temporal, in der Sagittalachse $0,8(\pm 0,1)$ mm ausgehend von okzipital und in der Longitudinalachse $0,5(\pm 0,1)$ mm (Abb. 4).

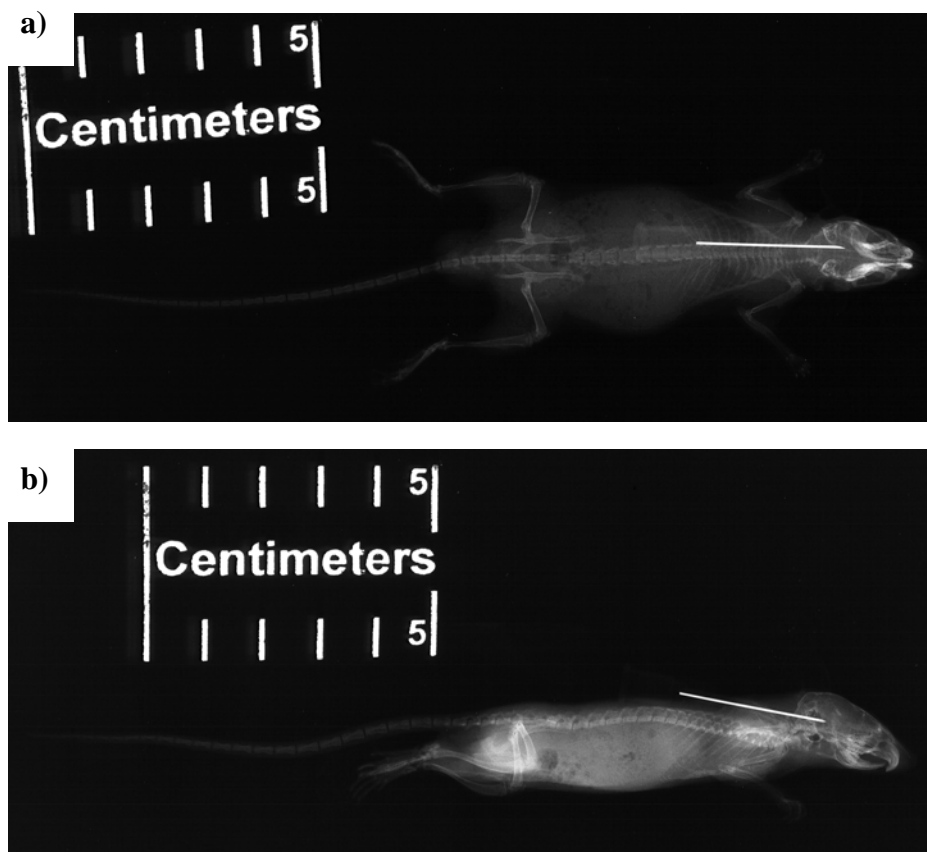


Abb. 4: Röntgenbild zur Positionierung einer Kanüle im Gehirn einer Maus (Stamm C 57 BL 6) zur in situ Applikation von Fluoreszenzfarbstoff. Röntgenaufnahme bei 40,5 KV, 5,6 mAs und 70 cm Abstand zur Kassette. Striche: Zentimeterangabe. a): Ansicht von dorsal, b): Seitenansicht.

3.6.4.2 Messung im Prototyp-Ganzkörper-Fluoreszenzdetektor

Jeder Maus sollte ein Injektionsvolumen von 100 μ l Farbstofflösung direkt ins Gehirn appliziert werden. Als Ausgangslösung wurden 150 nmole Cy5.5 in 1000 μ l PBS gelöst. In den verabreichten 100 μ l befanden sich folgende Mengen an Cy5.5:

Tab. 6: Schema der applizierten Menge an Cy5.5 in Mäusegehirne zur in situ Detektion von Fluoreszenzintensitäten des Fluorochroms in einem Ganzkörper-Fluoreszenzdetektor.

Mausnummer	Verabreichte Menge an Cy5.5 in nmolen
1-3	0,2
4-6	1,0
7-9	2,0
10-12	15,0
13-15	PBS

Die Applikation erfolgte mittels einer Spritze (Microliter Syringe) über die fixierte Kanüle. Durch den hohen Druck im Hirngewebe kam es zu einem Rücklauf der Farbstofflösung aus der Nadel. Dieser betrug schätzungsweise 20% des Gesamtvolumens und wurde entfernt, da dies ansonsten die Bildgebung im Prototyp-Ganzkörper-Fluoreszenzdetektor beeinträchtigt hätte.

Die Mäuse wurden in Bauchlage fixiert und unter Standardbedingungen im Prototyp-Ganzkörper-Fluoreszenzdetektor bei einer Laserleistung von 0,6 W gemessen.

4 Ergebnisse

4.1 Erprobung einer two-step fluorochromen Sonde an Hirngewebsschnitten von Alzheimerpatienten

Durch die Inkubation mit der two-step fluorochromen Sonde wurden in den Alzheimergewebsschnitten mit der höchsten Schichtdicke (100 μm) deutliche Fluoreszenzintensitäten im Prototyp-Ganzkörper-Fluoreszenzdetektor (SANIRF) detektiert. Ein signifikantes ($\alpha=5\%$) Fluoreszenzsignal konnte nur bei den vollständig mit der two-step Sonde inkubierten Alzheimerhirnschnitten (Fluoreszenzintensität: 670 ± 77 bE, 1 W) im Detektor gemessen werden. Die ebenfalls mit der two-step Sonde inkubierten Nicht-Alzheimerhirngewebsschnitte (Fluoreszenzintensität: 346 ± 85 bE, 1 W) sowie die Kontrollhirnschnitte, die nur mit Cy5.0-Streptavidin (222 ± 70 bE, 1 W) bzw. nur mit Blocklösung (220 ± 23 bE, 1 W) behandelt wurden, wiesen im Bezug auf die Grundintensität des Hintergrundes (220 bE, 1 W) keine signifikanten Fluoreszenzintensitäten auf. Im Gegensatz dazu hebt sich die Fluoreszenzintensität des vollständig mit der Sonde inkubierten Nicht-Alzheimerhirngewebes nach statistischer Auswertung nicht signifikant ($\alpha=5\%$) von den Kontrollen (Inkubation mit reiner Farbstofflösung bzw. reiner Blocklösung) ab. Ein Unterschied der Fluoreszenzintensitäten zwischen Hirnschnitten mit und ohne Vorbehandlung mit 8M Urea konnte aufgrund der gemessenen Werte nicht festgestellt werden (Abb. 5).

Der Nachweis des βA4 -Proteins im Prototyp-Ganzkörper-Fluoreszenzdetektor zeigte eine Abhängigkeit von der Gewebeschichtdicke. Bei Hirnschnitten von 5 μm und 20 μm Schichtdicke war im Prototyp-Ganzkörper-Fluoreszenzdetektor kein Fluoreszenzsignal detektierbar. Auch bei Erhöhung der D-Peptid-Konzentration (von 5 μM auf 500 μM) bzw. der Cy5.5-Menge (Verdünnung 1:400 auf 1:50) wurden keine Fluoreszenzintensitäten gemessen. Unter diesen Bedingungen konnte keine Unterscheidung zwischen Alzheimer- und Nicht-Alzheimerhirnschnitten bzw. zwischen gefärbten und ungefärbten Hirngeweben getroffen werden.

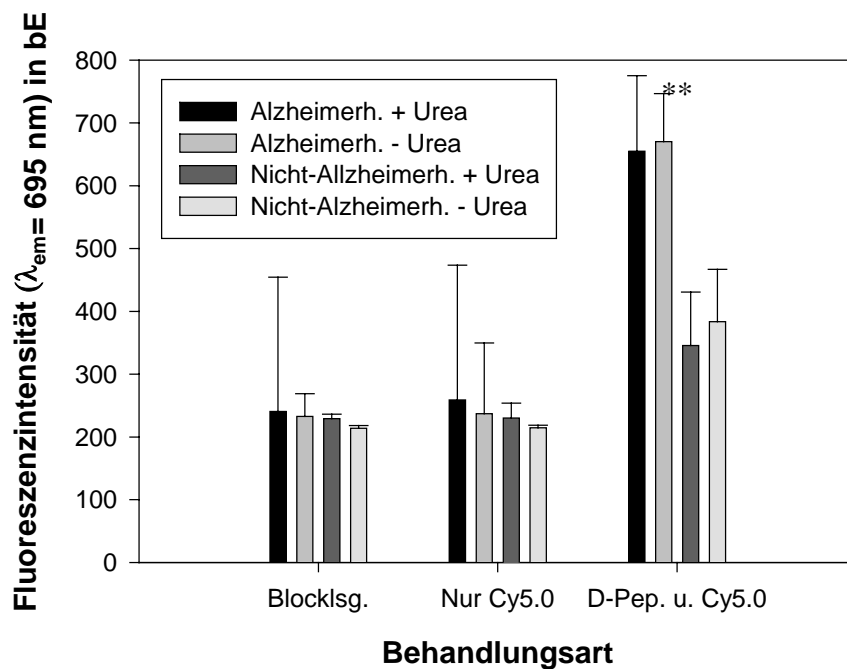


Abb. 5: Mittlere Fluoreszenzintensitäten ($\lambda_{em} = 695 \text{ nm}$) in Alzheimer- bzw. Nicht-Alzheimer-Hirnschnitten nach Behandlung mit einer fluorochromen Sonde (50 mM biotinyliertes D-Peptid, 750 nM Cy5.0-Streptavidin in Blockpuffer), Fluoreszenzfarbstoff (750 nM Cy5.0-Streptavidin in Blockpuffer) oder nur Blockpuffer (3% BSA in PBS). Vorbehandlung mit oder ohne 8 M Urea. Messung bei 1,0 W Laserleistung. b.E.= beliebige Einheiten für die Fluoreszenzintensität. **= signifikanter Unterschied ($\alpha = 5\%$) zu allen anderen abgebildeten Proben.

4.1.1 Alternative Darstellung der Alzheimerplaques mittels Immunhistologie

Durch die immun-histologische Färbung (Inkubation mit Anti-beta Amyloid-Antikörper und Anfärbung mittels APAAP-Komplex und Naphthol-AS-BI-Phosphat/Neufuchsin) wurde eindeutig die Anwesenheit von Alzheimerplaques in den verwendeten Hirnschnitten nachgewiesen. Die $\beta A4$ -Plaques stellten sich als intensiv rot angefärbte Areale dar. Sie waren zahlreich über den gesamten Hirnschnitt verteilt (Abb. 6).

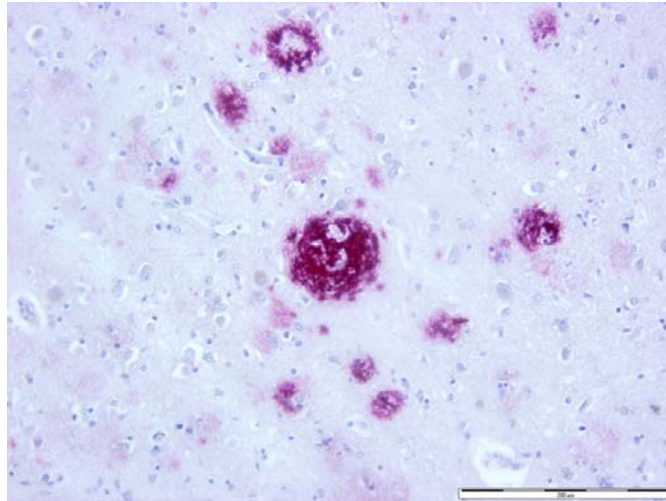


Abb. 6: Darstellung von β A4-Plaques in Hirngewebschnitten aus dem Parietallappen eines Alzheimer-patienten nach Inkubation mit einem Anti-beta Amyloid-Antikörper und Anfärbung mittels APAAP-Komplex und Naphthol-AS-BI-Phosphat/Neufuchsin. Rot: β A4-Plaques. Balken: 200 μ m.

4.2 Konzeption und Erprobung einer one-step fluorochromen Sonde zur Detektion von Alzheimerplaques im SANIRF-Imager

4.2.1 Separation der fluorochromen Sonde

Fluorochrom-markiertes D-Peptid wurde von unmarkiertem mittels High Pressure Liquid Chromatographie (HPLC) erfolgreich getrennt. Dabei konnten insgesamt neun Eluate anhand ihrer Absorptionspeaks bei einer Wellenlänge von 280 nm identifiziert und einzeln aufgefangen werden (Abb. 7):

Eluat 1 (Retentionszeit (RT): 4 min, 9 bE)

Eluat 2 (RT: 5,1 min, 18 bE)

Eluat 3 (RT: 5,8 min, 11 bE)

Eluat 4 (RT: 7,9 min, 15 bE)

Eluat 5 (RT: 13,2 min, 581 bE)

Eluat 6 (RT: 14,1 min, 340 bE)

Eluat 7 (RT: 18,2 min, 202 bE)

Eluat 8 (RT: 20,3 min, 249 bE)

Eluat 9 (RT: 22,8 min, 8 bE)

Außerdem wiesen die Eluate 7 und 8 makroskopisch eine starke Blaufärbung auf, während sich die anderen gewonnenen Eluate als klare Flüssigkeit zeigten. Eine Aussage über die Beschaffenheit der einzelnen Eluate konnte nach der chromatographischen Trennung noch nicht getroffen und damit auch die gekoppelte fluorochrome Sonde nicht eindeutig

identifiziert werden. Der Ausschlag bei einer Retentionszeit von 3,29 min wurde ignoriert, da es sich hierbei um ein bekanntes, säulenspezifisches Artefakt handelt.

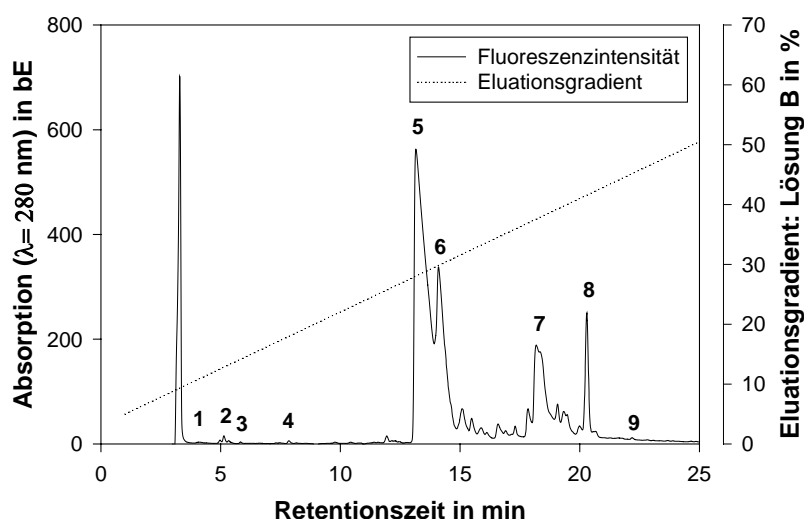


Abb. 7: Elutionsprofil bei der Auftrennung von fluorchrom-markiertem (Cy5.5) und unmarkiertem D-Peptid (100 µl) aus 3.5.2 mittels HPLC (Flussrate: 1 ml/min). Messung der Absorption bei einer Wellenlänge von 280 nm. Darstellung des Elutionsgradienten ((prozentualer Anteil Lösung B (80% ACN+0,1% TFA) bei entsprechender Retentionszeit (Lösung A+B=100%). Lösung A (H₂O+ 0,1% TFA)). 1-9: Bezeichnung der Fluoreszenzintensitätenpeaks, deren korrespondierende Eluate aufgefangen wurden. b.E.= Absorption bei einer Wellenlänge von 280 nm.

4.2.2 Charakterisierung der in der HPLC gewonnenen Eluate mittels Spectrofluorometrie

Mittels Spectrofluorometrie konnte das fluorchrom-markierte D-Peptid (one-step Sonde) eindeutig von den übrigen Eluatens der HPLC (4.2.1) unterschieden werden. Das Emissionsspektrum des Eluates 7 (Emissionsmax. bei 682 und 702 nm) war vergleichbar mit dem der Positivkontrolle (15 nmole Cy5.5 in Aqua dest., Emissionsmax. bei 675 und 695 nm). Die Negativkontrolle (Elutionslösung der entsprechenden Retentionszeit des Eluates 7) wies, wie alle anderen während der HPLC gewonnenen Proben, keinerlei Emissionsmaxima auf. Nur bei Eluat 6 konnte ein Peak (675 nm) gemessen werden, jedoch fehlte der für den Farbstoff Cy5.5 spezifische zweite Gipfel (Abb. 8).

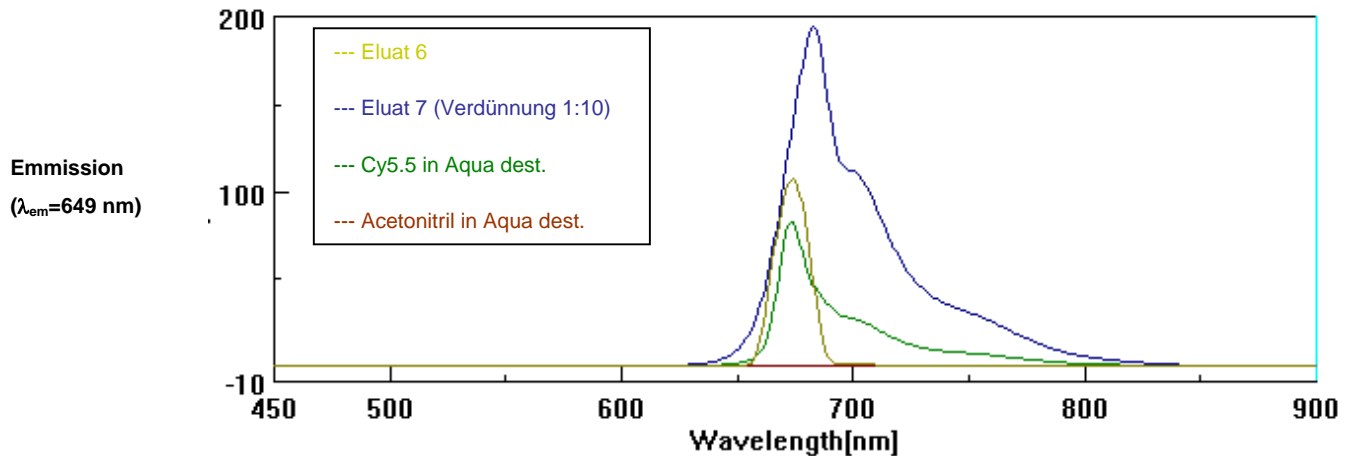


Abb. 8: Charakterisierung der fluorochromen Eigenschaften ausgewählter Eluate nach Aufreinigung der one-step fluorochromen Sonde mittels HPLC (Siehe Abb. 5). Eluat 6: unverdünnt, Eluat 7: Verdünnung 1:10 mit Aqua dest., Positivkontrolle: 15 nmole Cy5.5 in Aqua dest. und Negativkontrolle: Elutionslösung (36,37% einer 80%igen Acetonitrillösung in Aqua dest.). Bestimmung der Fluoreszenz bei $\lambda_{em}=649$ nm mittels Spectrofluorometrie.

4.2.3 Erprobung der konzipierten one-step fluorochromen Sonde an Alzheimer-Gehirnschnitten

Eine bildgebende Darstellung des β A4-Proteins in Hirngewebsschnitten im Prototyp-Ganzkörper-Fluoreszenzdetektor wurde durch Inkubation mit der one-step fluorochromen Sonde erreicht (Abb. 9). Signifikant ($\alpha=5\%$) höhere Fluoreszenzintensitäten im Prototyp-Ganzkörper-Fluoreszenzdetektor zeigte die Behandlung von Alzheimerhirngewebe mit dem fluorochrom-markierten D-Peptid (476 ± 41 bE, 1 W) gegenüber dem gleichbehandelten Nicht-Alzheimerhirngewebe (228 ± 5 bE, 1 W) sowie der Negativkontrolle (Inkubation nur mit Blocklösung, 223 ± 4 bE, 1 W). Damit liegen der mit der one-step Sonde behandelte Nicht-Alzheimerhirngewebsschnitt und die Negativkontrolle (Inkubation nur mit Blocklösung) im Bereich der Grundfluoreszenzintensität des Hintergrundes (220 bE, 1 W). Kein signifikanter ($\alpha=5\%$) Unterschied der Fluoreszenzintensität wurde bei der Behandlung der Alzheimerhirnschnitte mit der one-step (476 ± 41 bE, 1 W) im Vergleich zu der two-step Methode (436 ± 33 bE, 1 W) festgestellt. Bei Betrachtung der Nicht-Alzheimerhirngewebsschnitte hingegen wies die mit der two-step fluorochromen Sonde inkubierte Hirngewebsprobe eine etwas höhere Intensität (315 ± 22 bE, 1 W) gegenüber des nach der one-step Methode behandelten Nicht-Alzheimerhirnschnittes (228 ± 5 bE, 1 W) auf (Abb. 10).

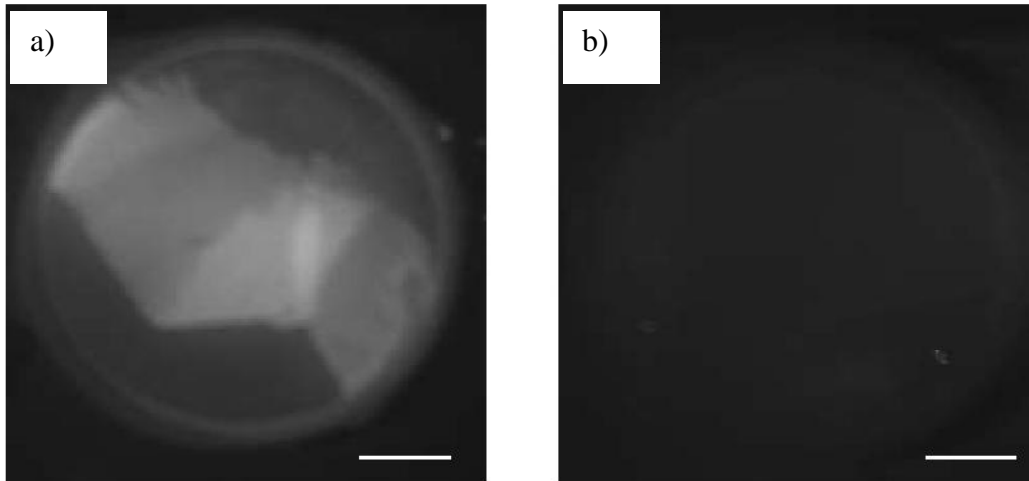


Abb. 9: Typisches Fluoreszenzbild ($\lambda_{em}= 695 \text{ nm}$, 1 W) von Hirngewebsschnitten ($100 \mu\text{m}$) nach Inkubation mit $50 \mu\text{M}$ einer one-step fluorochromen Sonde (Fluorochrom(Cy5.5)-markiertes D-Peptid) zum Nachweis des βA4 -Proteins. Bild unter Verwendung eines Prototyp-Ganzkörper-Fluoreszenzdetektors. a) Alzheimerhirngewebe, b) Nicht-Alzheimerhirngewebe.

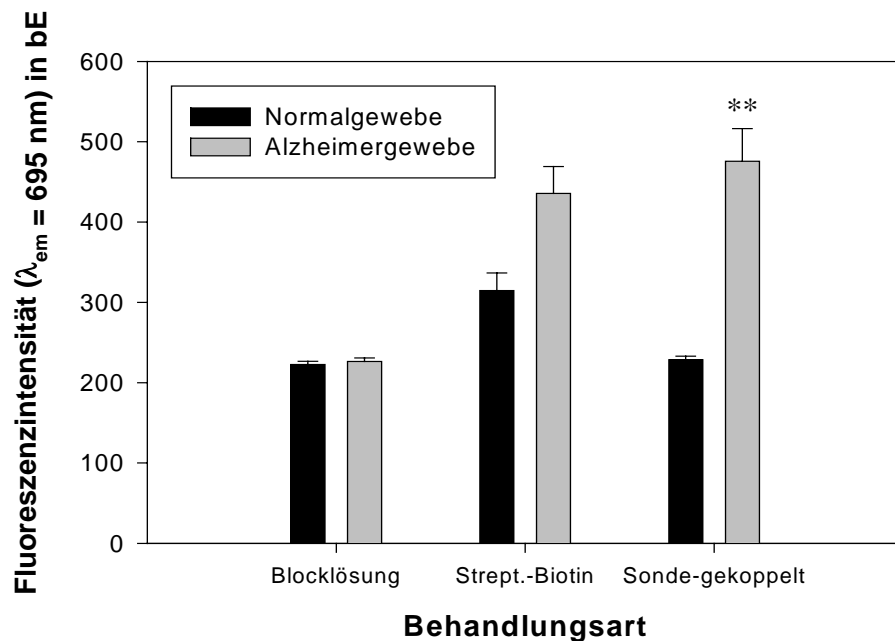


Abb. 10: Mittlere Fluoreszenzintensitäten ($\lambda_{em}= 695 \text{ nm}$) in Alzheimer- bzw. Nicht-Alzheimer-Hirnschnitten nach Behandlung mit einer one-step fluorochromen Sonde ($50 \mu\text{M}$), einer two-step fluorochromen Sonde (biotinyliertes D-Peptid ($50 \mu\text{M}$), Cy5.0-Streptavidin (Verdünnung 1:200 in Blockpuffer)) oder nur Blockpuffer (3% BSA in PBS). Messung bei 1,0 W Laserleistung. b.E.= beliebige Einheiten für die Fluoreszenzintensität. **: signifikanter Unterschied ($\alpha= 5\%$) zu den Kontrollen (Nicht-Alzheimergewebe, Blockpuffer).

4.3 Erprobung eines Modellfluorochroms an Phantomen

4.3.1 Verhalten der detektierbaren Fluoreszenz in Abhängigkeit von der Gewebeschichtdicke

Die Abschwächung der Fluoreszenzintensitäten in Abhängigkeit von der Gewebeschichtdicke konnte im Prototyp-Ganzkörper-Fluoreszenzdetektor dargestellt werden (Abb. 11). Dabei zeigten die Fluoreszenzintensitäten einen exponentiellen Abfall mit Zunahme der Hirngewebssdicke der Proben von 0 (ohne Hirngewebe) bis $5 \pm 0,1$ mm Gewebeschichtdicke. Einen typischen Verlauf zeigt Abbildung 12 bei einer mittleren Laserleistung von 0,6 W und einer Farbstoffmenge von 225 pmol Cy5.5. Dabei wurden Werte der Fluoreszenzintensität von $2121,5 \pm 72,7$ bE ohne Hirn bis zu $258,2 \pm 12,1$ bE bei einer Hirngewebsschicht von 5 mm gemessen. Ab einer Hirngewebssdicke von $5 \pm 0,1$ mm konnte ein signifikanter Unterschied ($\alpha = 5\%$) von der Fluoreszenz des Hintergrundes nur noch ab einer Fluorochrommenge von 750 nmol festgestellt werden (Laserleistung 0,2W). Dabei unterschieden sich die Fluoreszenzintensitäten um 41 bE. Sie lagen bei 0 pmol bei 211 ± 4 bE und bei 750 pmol bei 252 ± 11 bE (Abb. 13).

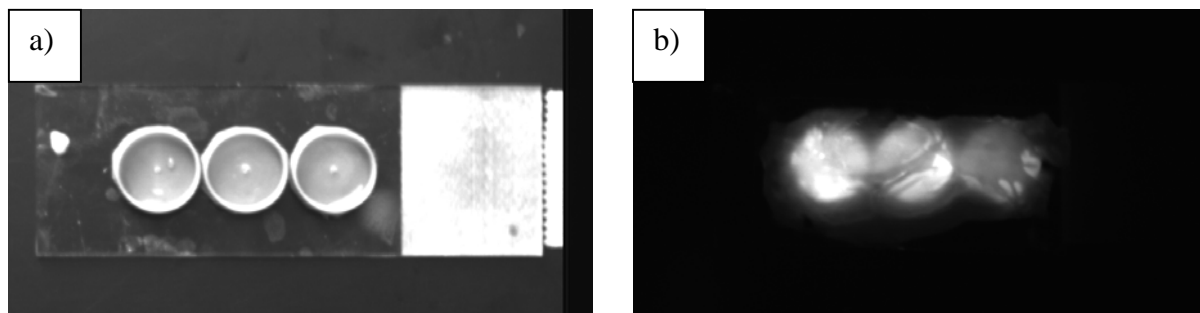


Abb. 11: Typisches Licht- und Fluoreszenzbild von Cy5.5-Lösungen (0,45 bis 1,2 nmole Cy5.5 in 150 μ l NaCl) nach Befüllung von Steckhülsen auf einem Objektträger. Bilder unter Verwendung eines Prototyp-Ganzkörper-Fluoreszenzdetektors. a) Nativaufnahme ohne Hirngewebe, b) Fluoreszenzbild ($\lambda_{em} = 695$ nm) nach Bedeckung mit 1mm Schweinehirn, Laserleistung 0,4W

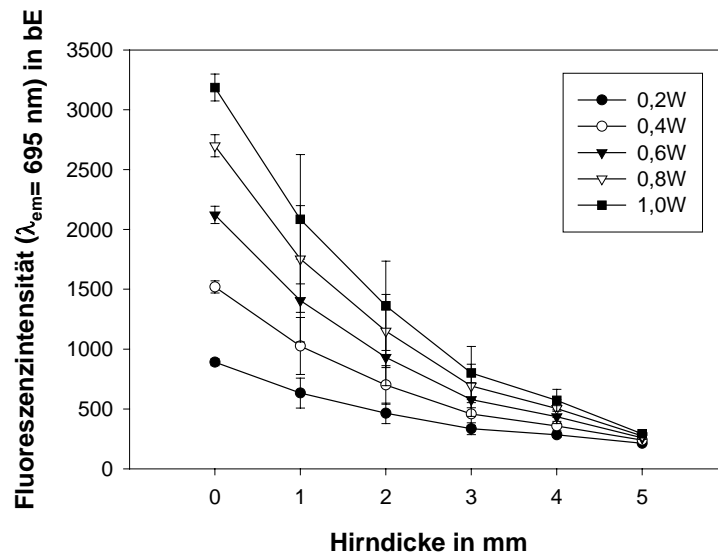


Abb. 12: Abschwächung der Fluoreszenzintensitäten ($\lambda_{em} = 695 \text{ nm}$) von Cy5.5-haltigen Lösungen (225 pmole Cy5.5 in 150 μl NaCl) in Abhängigkeit von der Hirngewebsschichtdicke (0 bis 5 mm). Die Messungen erfolgten im Prototyp-Ganzkörper-Fluoreszenzdetektor bei Laserleistungen von 0,2 bis 1,0 W. Anordnung der Proben wie in Abb. 11 dargestellt. b.E.= beliebige Einheiten für die Fluoreszenzintensität.

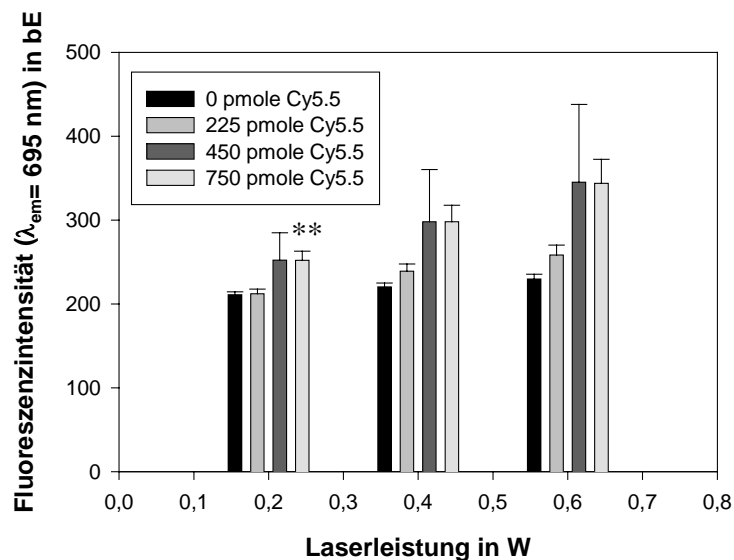


Abb. 13: Abschwächung der Fluoreszenzintensitäten ($\lambda_{em} = 695 \text{ nm}$) von Cy5.5-haltigen Lösungen in Abhängigkeit von der Laserleistung (0,2 bis 0,6 W) und der Menge Cy5.5 (0 bis 750 nmole in 150 μl NaCl) bei einer Hirngewebsschichtdicke von 5 mm. Die Messungen erfolgten in einem Prototyp-Ganzkörper-Fluoreszenzdetektor. Anordnung der Proben wie in Abb. 11 dargestellt. bE= beliebige Einheiten für die Fluoreszenzintensität. **: signifikanter Unterschied ($\alpha = 5\%$) zu der Grundfluoreszenz des Hintergrundes von 205 bE.

Erwartungsgemäß konnte eine Abhängigkeit der Fluoreszenzintensitäten von der Menge an Fluorochrom innerhalb einer Hirngewebsschichtdicke und bei einer konstanten Laserleistung festgestellt werden. Die Messergebnisse wiesen bei allen Laserleistungen (0,2 W bis 1,0 W) einen linearen Anstieg der Fluoreszenzintensitäten mit ansteigender Cy5.5-Menge (0,225 nmolen bis 1,2 nmolen) auf (Abb. 14). Dabei konnte ein Wert der Fluoreszenzintensität von 242 ± 10 bE bei 0 pmolen Cy5.5 gemessen werden, der bis auf 2550 ± 759 bE bei 1,2 nmolen anstieg. Dieser 0-Wert (0 pmole Cy5.5 in 150 μ l physiologischer Kochsalzlösung (NaCl)) lag im Bereich der Eigenfluoreszenz der Messvorrichtung (224 ± 8 bE). Diese Abhängigkeit ist bei allen gemessenen Laserleistungen vergleichbar, nur steigen die Werte bei einer höheren Energiezufuhr entsprechend stärker an bzw. fallen bei geringerer Energiezufuhr entsprechend ab (Abb. 14).

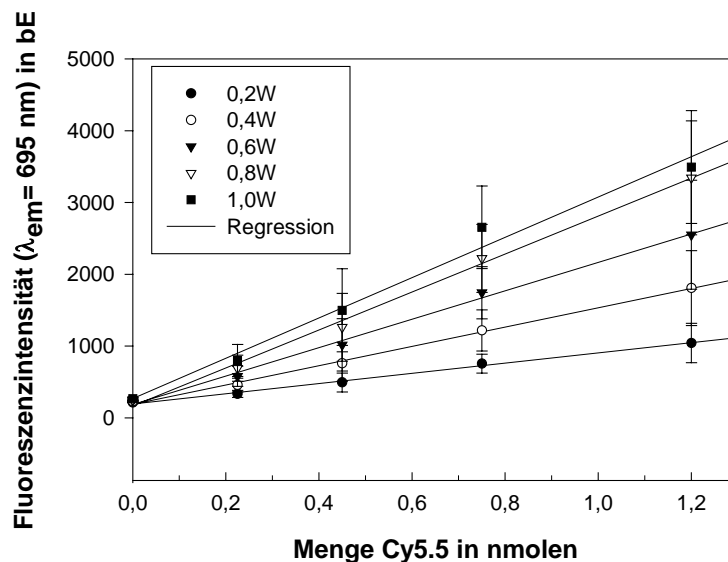


Abb. 14: Fluoreszenzintensitäten ($\lambda_{em} = 695$ nm) von fluorochromhaltigen Farbstofflösungen in Abhängigkeit von der Menge Cy5.5 (0 bis 1,2 nmole in 150 μ l NaCl). Die Messungen erfolgten im Prototyp-Ganzkörper-Fluoreszenzdetektor bei Laserleistungen von 0,2 bis 1,0 W und einer Hirngewebsschichtdicke von 3mm. Anordnung der Proben wie in Abb. 11 dargestellt. bE= beliebige Einheiten für die Fluoreszenzintensität.

Eine Abhängigkeit von der Laserleistung konnte erwartungsgemäß bei allen untersuchten Ansätzen (Variation der Cy5.5-Menge und Gewebeschichtdicke) festgestellt werden. Dabei kam es zu einem stetigen Anstieg der Fluoreszenzintensitäten mit Erhöhung der Laserleistung (Abb. 15). Beispielsweise stiegen die Fluoreszenzintensitäten bei einer Menge von 450 pmolen Cy5.5 und einer Hirngewebsschichtdicke von $3 \text{ mm} \pm 0,1 \text{ mm}$ von 494 ± 132 bE bei

0,2 W bis auf 1499 ± 578 bE bei 1,0 W an. Unter definierten Bedingungen (Laserleistung 0,8 W, 1,2 nmole Cy5.5 und Hirndicke 3 mm) ging bei 3500 bE der Anstieg der Fluoreszenzintensitäten in eine Sättigung über (Abb. 15). Bei allen anderen untersuchten Ansätzen trat eine Sättigung erst ab einer Fluoreszenzintensität von 4000 bE auf.

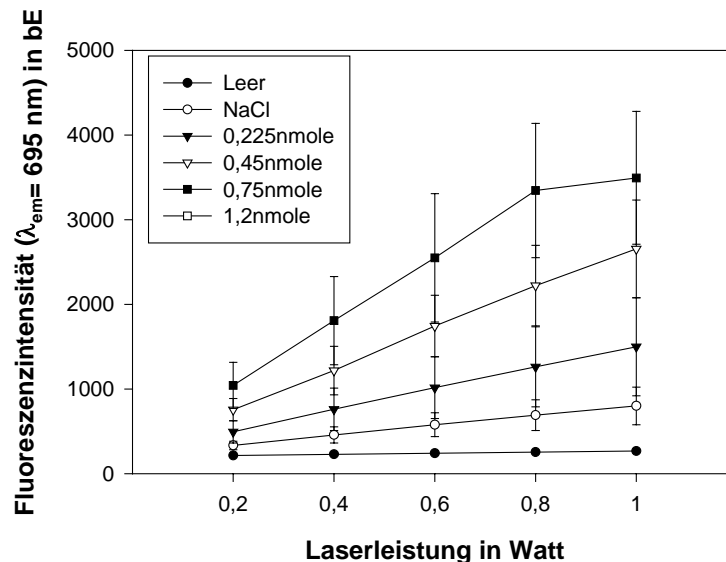


Abb. 15: Fluoreszenzintensitäten ($\lambda_{em} = 695$ nm) von Cy5.5-haltigen Lösungen (0 bis 1,2 nmole in 150 μ l NaCl) in Abhängigkeit von der Laserleistung (0,2 bis 1,0 W) und einer Hirngewebisdicke von 3 mm. Die Messungen erfolgten im Prototyp-Ganzkörper-Fluoreszenzdetektor. Anordnung der Proben wie in Abb. 8 dargestellt. b.E.= beliebige Einheiten für die Fluoreszenzintensität.

4.3.2 In situ Detektierbarkeit der emittierten Fluoreszenz in Gehirnphantomen

4.3.2.1 Detektierbarkeit des Fluorochroms bei homogener Verteilung in Gehirnphantomen

Die Fluoreszenzintensität von homogen verteilten Cy5.5 Molekülen in Gehirnphantomen zeigt erwartungsgemäß einen Anstieg mit zunehmender Fluorochrommenge von 0,02 nmolen Cy5.5 (274 ± 12 bE, 0,2 W) bis 15 nmolen Cy5.5 (4095 ± 17 bE, 0,2 W). Dieser Anstieg war bereits makroskopisch erkennbar (Abb.16). Der Fluoreszenzwert bei 15 nmolen Cy5.5 lag im Bereich der Sättigung. Ein signifikanter ($\alpha = 1\%$) Unterschied von der Kontrolle (Gehirnphantom ohne Cy5.5, 211 ± 3 bE, 0,2 W) war bereits oberhalb einer Menge von 0,02 nmolen Cy5.5 (274 ± 12 bE, 0,2 W) detektierbar (Abb.17).

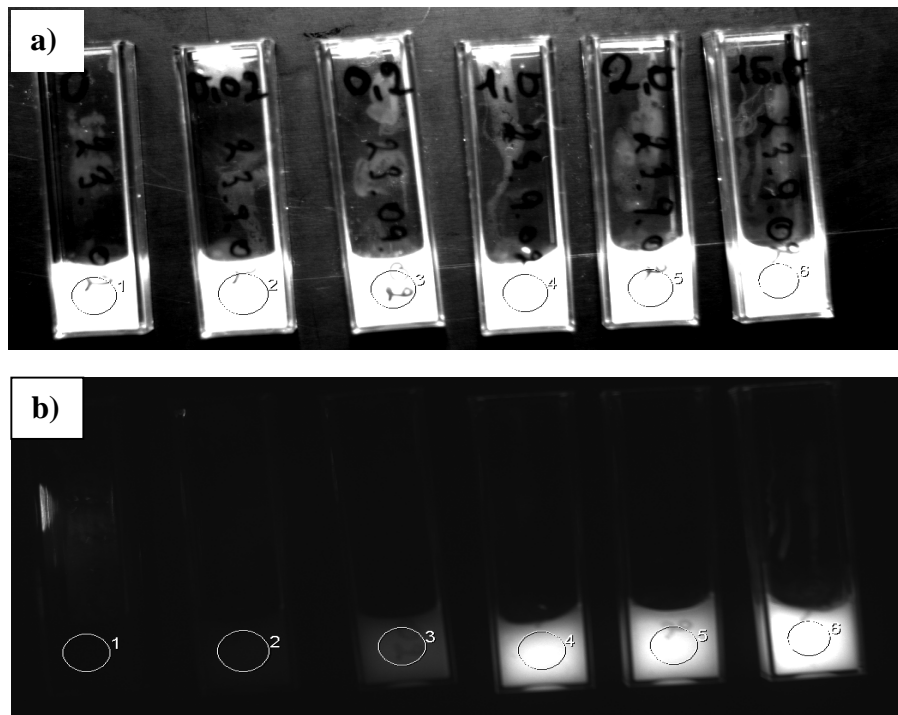


Abb. 16: Typisches Licht- und Fluoreszenzbild von Cy5.5-haltigen (0 bis 15 nmole Cy5.5) Gehirphantomen (1,1 ml), bestehend aus püriertem Schweinehirn und einer 15%igen Gelatinelösung im Verhältnis 1:2. Bilder unter Verwendung des Prototyp-Ganzkörper-Fluoreszenzdetektors. Kreise: Regions of interest (ROIs). a) Nativbild, b) Fluoreszenzbild ($\lambda_{em}=695\text{ nm}$) bei einer Laserleistung von 0,2W.

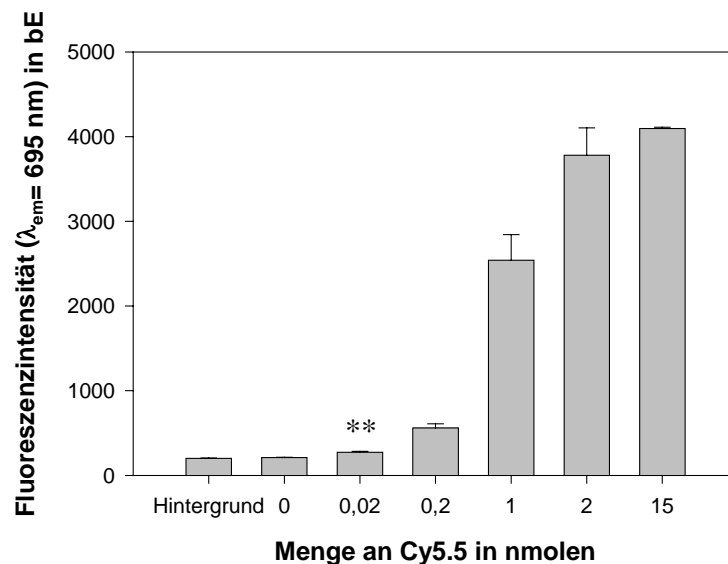


Abb. 17: Fluoreszenzintensitäten ($\lambda_{em}=695\text{ nm}$) in Abhängigkeit von der Cy5.5-Menge nach homogener Verteilung in Gehirphantomen (0,5 ml püriertes Schweinehirn, 0,5 ml 15%iger Gelatinelösung und 0,1 ml Cy5.5-haltiger Lösung) bei einer Laserleistung von 0,2 W. Messungen unter Verwendung eines Prototyp-Ganzkörper-Fluoreszenzdetektors. b.E.= beliebige Einheiten für die Fluoreszenzintensität. \geq^{**} : Signifikanter Unterschied ($\alpha=1\%$) zur Grundfluoreszenz des Hintergrundes von 205 bE.

4.3.2.2 Abschwächung der Fluoreszenzintensität des Fluorochroms durch die Schädelkalotte

Homogen verteilte Cy5.5-Moleküle in Gehirnphantomen zeigten innerhalb der Schädelkalotte einer Maus einen Anstieg der Fluoreszenzintensität mit steigender Fluorochrommenge. Mengen von 0,02 nmolen und 0,2 nmolen Cy5.5 wiesen bei allen Laserleistungen (0,2 W bis 1,0 W) im Prototyp-Ganzkörper-Fluoreszenzdetektor deutlich höhere Fluoreszenzintensitäten im Vergleich zu den Kontrollen (Gehirnphantom ohne Fluorochrom) auf (Abb. 18). Keine signifikanten Unterschiede ($\alpha = 5\%$) der Fluoreszenzintensitäten (Laserleistung 0,2 W, 0,2 nmole Cy5.5) zeigte der Vergleich der Gehirnphantome innerhalb ($573,9 \pm 33,2$ bE) und außerhalb (562 ± 48 bE) der Schädelkalotte. Auch bei allen anderen untersuchten Ansätzen (Variation der Fluorochrommenge und Laserleistung) konnte keine signifikante Abschwächung der Fluoreszenzintensität durch die Schädelkalotte festgestellt werden (Abb. 19).

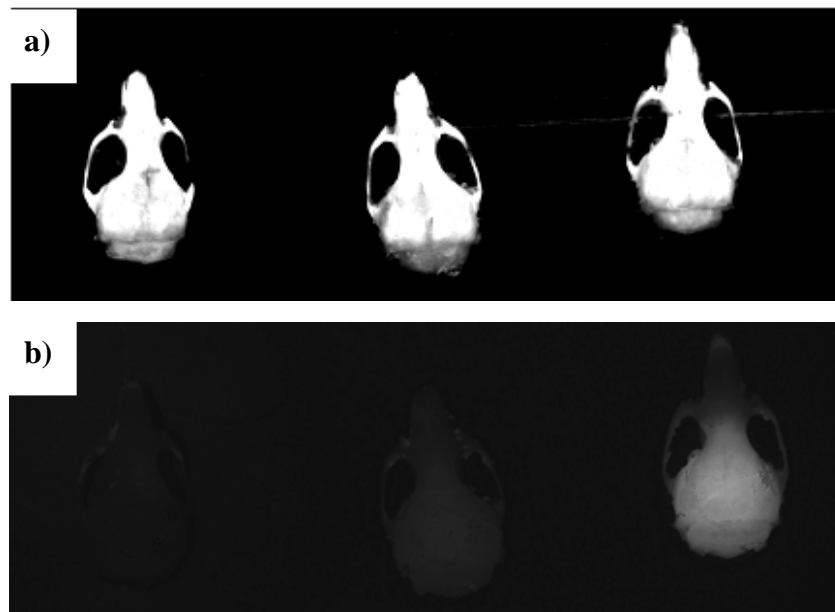


Abb. 18: Typisches Licht- und Fluoreszenzbild von Cy5.5-haltigen (0 bis 0,2 nmole Cy5.5) Gehirnphantomen (1,1 ml), bestehend aus püriertem Schweinehirn und einer 15%igen Gelatinelösung im Verhältnis 1:2 in präparierten Mäuseschädeln. Bilder unter Verwendung eines Prototyp-Ganzkörper-Fluoreszenzdetektors. a) Nativbild, b) Fluoreszenzbild ($\lambda_{em} = 695$ nm) bei einer Laserleistung von 1,0 W

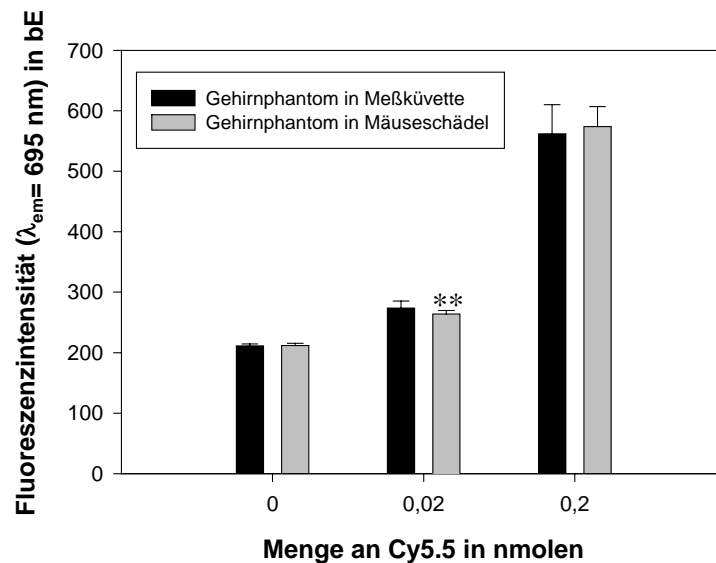


Abb. 19: Vergleich der mittleren Fluoreszenzintensitäten ($\lambda_{em} = 695 \text{ nm}$) von Cy5.5 in homogenen Gehirnphantomen (0,5 ml püriertes Schweinehirn, 0,5 ml 15%iger Gelatinelösung und 0,1 ml Cy5.5 in PBS) innerhalb und außerhalb der Schädelkalotte von Mäusen unter Verwendung eines Prototyp-Ganzkörper-Fluoreszenzdetektors. Laserleistung: 0,2 W. b.E.= beliebige Einheiten für die Fluoreszenzintensität. $\geq **$: signifikanter Unterschied ($\alpha = 5\%$) zu der Kontrolle (0 nmole Cy5.5).

4.3.3 Verhalten der Fluoreszenzintensitäten des Fluorochroms nach in situ Applikation in Mäusegehirne

Die Fluoreszenzintensitäten des Cy5.5 Farbstoffes nach in situ Applikation in Mäusegehirne stellten sich makroskopisch als lokal begrenzte Fluoreszenzareale dar. Das Nativbild zeigt, dass diese Fluoreszenzareale innerhalb der Schädelkalotte liegen (Abb. 20). Die Fluoreszenzintensitäten zeigten einen Anstieg mit steigender Fluorochrommenge (Abb. 21). Dabei stiegen die Fluoreszenzwerte von $631 \pm 151 \text{ bE}$ (1,0 nmole Cy5.5) bis auf $3658 \pm 380 \text{ bE}$ (15 nmolen Cy5.5) an (Laserleistung 0,6 W) (Abb. 18). Nach Applikation der geringsten Dosis Cy5.5 (0,2 nmole) konnten noch signifikante ($\alpha = 5\%$) Fluoreszenzintensitäten ($279 \pm 25 \text{ bE}$) gegenüber den Kontrollen mit PBS ($211 \pm 4 \text{ bE}$) detektiert werden (Laserleistung 0,6 W).

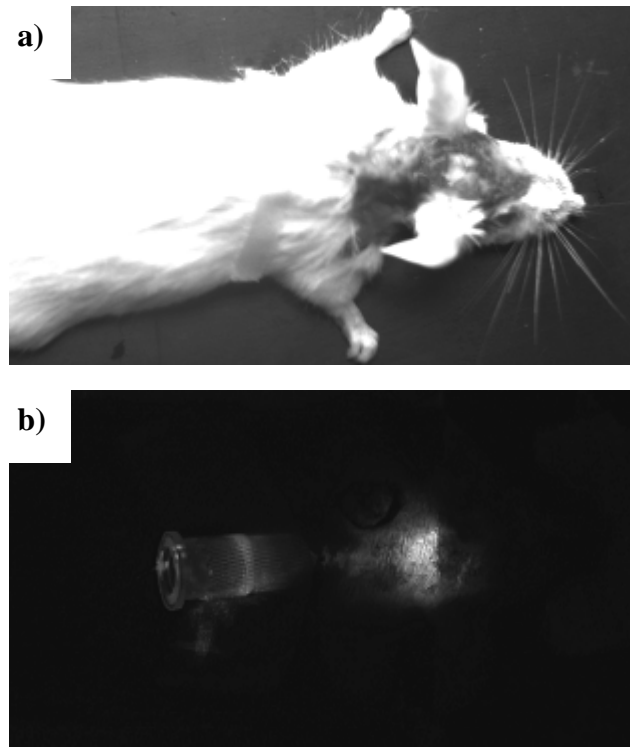


Abb. 20: Typische Licht- und Fluoreszenzbilder nach Applikation einer Cy5.5-haltigen Lösung (2,0nmole Cy5.5 in 100 μ l PBS) im Gehirn von Mäusen (BALB/c). Bilder unter Verwendung eines Prototyp-Ganzkörper-Fluoreszenzdetektors. a) Nativbild, b) Fluoreszenzbild (λ_{em} = 695 nm) bei einer Laserleistung von 1,0 W.

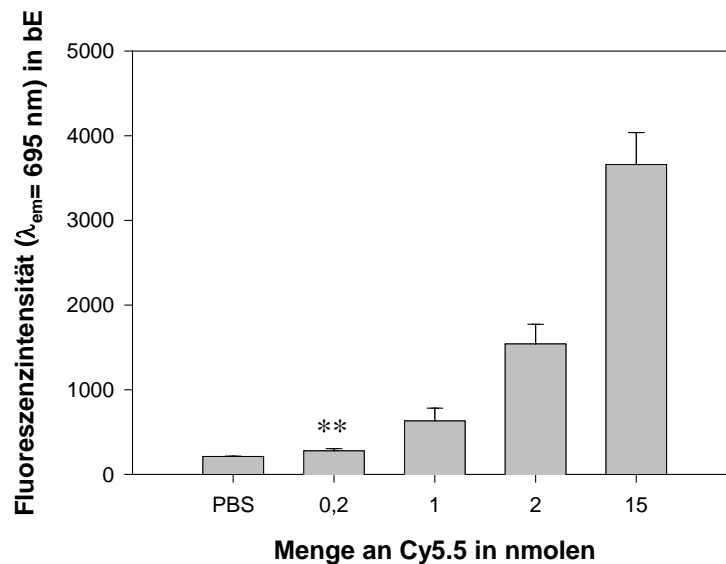


Abb. 21: Darstellung der mittleren Fluoreszenzintensitäten (λ_{em} = 695 nm) unterschiedlicher Mengen an Cy5.5 (0,2 bis 15 nmole Cy5.5 in 100 \pm 20 μ l PBS) nach in situ Applikation in Mäusegehirne (Großhirnhemisphären). Messung im Prototyp-Ganzkörper-Fluoreszenzdetektors. Laserleistung; 0,6 W. b.E.= beliebige Einheiten für die Fluoreszenzintensität. \geq **: signifikanter Unterschied (α = 5%) zur Kontrolle (PBS).

5 Diskussion

Die Untersuchungen haben gezeigt, dass es möglich ist, Alzheimerplaques mit einer fluorochromen Sonde zu markieren und mit einem Prototyp-Ganzkörper-Fluoreszenzdetektor darzustellen. Dabei zeigten sich definierte Wechselwirkungen mit dem Gehirngewebe. Die Abhängigkeit dieser Wechselwirkungen von den zugrunde liegenden Parametern (Laserleistung des Detektors, Hirngewebsschichtdicke und verwendete Menge des Modellfluorochroms) konnte erprobt und definiert werden.

5.1 Erprobung einer two-step fluorochromen Sonde an Hirngewebsschnitten von Alzheimerpatienten

Die Ergebnisse bei in vitro Untersuchungen an Hirnschnitten zeigen, dass prinzipiell eine spezifische Bildgebung von Alzheimerplaques durch eine fluorochrome Sonde im Prototyp-Ganzkörper-Fluoreszenzdetektor möglich ist. Diese Aussage wird belegt durch das Resultat, dass ein signifikantes Fluoreszenzsignal nur bei Alzheimerhirnschnitten nach Inkubation mit dem biotinylierten D-Peptid und dem Cy5.5-Streptavidin im SANIRF-Imager zu detektieren war. Eine Behandlung von Nicht-Alzheimerhirngewebe mit der two-step fluorochromen Sonde mit den beiden genannten Komponenten konnte kein signifikantes Fluoreszenzsignal im Prototyp-Ganzkörper-Fluoreszenzdetektor hervorrufen. Ebenfalls kein Unterschied der Fluoreszenzintensität im Vergleich zum Untergrund wurde bei den Kontrollen (Behandlung beider Gewebearten nur mit Cy5.0-Streptavidin oder Blocklösung) festgestellt. Auch nach mehrfacher Wiederholung des Experimentes konnten Fluoreszenzsignale nur nach Behandlung von Alzheimerhirnschnitten mit der two-step fluorochromen Sonde gemessen werden. Diese Tatsachen beweisen eine Spezifität der fluorochromen Sonde zur Markierung von Alzheimerplaques. Dies bestätigt zunächst die Ergebnisse der Forschungsgruppe in Jülich, die das D-Peptid bereitstellte. Dabei wurde das D-Peptid jedoch mit Fluorescein gekoppelt und lichtmikroskopisch ausgewertet (Wiesehan et al. 2003). Die vorliegenden Ergebnisse gehen darüber hinaus und zeigen, dass eine Bildgebung mit einem Prototyp-Ganzkörper-Fluoreszenzdetektor möglich ist. Im Vergleich dazu ist in der Literatur eine unspezifische Markierung von β A4-Ablagerungen in Alzheimerhirnschnitten (Hippocampus und Cortex) mit (*trans-trans*),-1-bromo-2,5-bis-(3-hydroxycarbonyl-4-hydroxy)styrylbenzene (BSB) (Skovronsky et al. 2000) beschrieben. Diese Methode weist im Vergleich zu einer Inkubation mit dem D-Peptid eine geringere Spezifität gegenüber dem β A4-Protein auf, da es

neben den Alzheimerplaques auch Neurofibrillen, Lewy-Körperchen und Zelleinschlüsse von Gliazellen markiert. Aus diesem Grund ist ein Nachweis von BSB nicht alzheimerspezifisch, sondern auch positiv bei Patienten mit Morbus Parkinson oder multipler systemischer Atrophie.

Unter Beibehaltung aller Versuchsbedingungen konnte ein Fluoreszenzsignal erst ab einer Hirngewebsschnittstärke von 100 μm detektiert werden. Bei dünneren Alzheimerhirngewebsschnitten ist der Gehalt an senilen Plaques und der damit verbundenen Menge der fluorochromen Sonde zu gering, um im Prototyp-Ganzkörper-Fluoreszenzdetektor signifikante Fluoreszenzintensitäten zu messen. Das liegt daran, dass der Prototypdetektor zur Ganzkörperdarstellung von Fluoreszenzfarbstoffen in Kleintieren entwickelt wurde und nicht für Hirngewebsschnitte. Daher ist er weniger sensitiv und eine Bildgebung einzelner Amyloidplaques ist nicht möglich, da das Gerät Fluoreszenzintensitäten der einzelnen Areale nur in Originalgröße darstellen kann und über keine mikroskopischen Eigenschaften verfügt. Mit dem in der Literatur beschriebenen Sondenmolekül BSB lassen sich die Amyloidablagerungen bereits in Alzheimerhirnschnitten ab einer Dicke von 5 μm darstellen (Skovronsky et al. 2000). Jedoch erfolgt ein Nachweis nicht in einem Ganzkörper-Fluoreszenzdetektor, sondern unter einem Fluoreszenzmikroskop. Durch ihre hohe Sensitivität eignet sich die Fluoreszenzmikroskopie für *in vitro* Untersuchungen an Hirnschnitten im Vergleich besser als der Prototyp-Ganzkörper-Fluoreszenzdetektor. Unter *in vivo* Bedingungen ist zum spezifischen Nachweis des βA4 -Proteins mit dem Fluoreszenzmikroskop im Gegensatz zu einem Nachweis im Prototyp-Ganzkörper-Fluoreszenzdetektor eine Entnahme von Gewebe notwendig.

Die Ergebnisse zeigen, dass eine spezifische Detektion des βA4 -Proteins mit dem Prototyp-Ganzkörper-Fluoreszenzdetektor grundsätzlich möglich ist. Wie bereits ausgeführt, wurde dieser Detektor für eine Bildgebung von Fluoreszenzfarbstoffen in Kleintieren entwickelt. Für einen Nachweis des βA4 -Proteins im menschlichen Gehirn sollte idealerweise ein Gerät entwickelt werden, das die gesamte Schädelhöhle erfasst. Die senilen Plaques sind im Frühstadium hauptsächlich im Hippocampus und Temporallappen lokalisiert, jedoch kommt es auch zu Ablagerungen im Cortex des Frontal- und Parietallappens. Deshalb müssen alle diese Regionen mit dem Detektor erfasst werden können.

Hirngewebesschnittstärken ab 100 μm waren im Prototyp-Ganzkörper-Fluoreszenzdetektor darstellbar. Dabei kam es zur Signalamplifikation durch Erhöhung der Anzahl der Plaques im

Hirnschnitt und damit zu vermehrten Bindungsstellen für das fluorochrom-markierte D-Peptid gegenüber dünneren Gewebeproben (5 bis 20 μm). Deren Signal war zu gering, um im Prototyp-Ganzkörper-Fluoreszenzdetektor dargestellt zu werden. Eine Signalamplifikation ist auch bei einer in vivo Detektion von senilen Plaques mit der konzipierten Sonde im menschlichen Gehirn zu erwarten, denn die verwendeten 100 μm Hirnschnitte wiesen ein Volumen von ca. $0,02\text{ cm}^3$ ($2\text{ cm} \times 1\text{ cm} \times 0,01\text{ cm}$) auf, das gesamte humane Gehirn hat dagegen ein Volumen von 1400 bis 1500 cm^3 (Michels und Welde 2003). Geht man davon aus, dass pro Gramm Alzheimergewebe durchschnittlich etwa 2000 pmole βA4 -Protein abgelagert ist (Wang et al. 1999), so würde sich die Anzahl der Bindungsstellen für die fluorochrome Sonde um ein Vielfaches erhöhen und damit auch die gemessene Fluoreszenzintensität. Dies ist für eine in vivo Detektion auch notwendig, da ein Fluoreszenzsignal von 670 bE, wie es in den 100 μm Hirnschnitten gemessen wurde, nicht ausreicht, um durch die humane Schädelkalotte (Dicke 3 bis 8 mm) detektiert zu werden, was die folgenden Phantomversuche beweisen.

Die beschriebenen Beobachtungen zum Nachweis des βA4 -Proteins in einem Prototyp-Ganzkörper-Fluoreszenzdetektor basieren auf einer Laserleistung von 1 W. Diese verwendete Laserleistung ist im Vergleich zu anderen Studien äußerst gering. Bei Untersuchungen zur Tumordarstellung mit fluorochrommarkierten Antikörpern in Kleintieren wurden bereits Laserleistungen bis 150 W angewandt (Weißleder et al. 1999). Wie die nachfolgenden Phantomversuche zeigen, ließe sich eine Steigerung der Fluoreszenzintensitäten der mit der Sonde markierten Alzheimerplaques durch eine Steigerung der Laserleistung erreichen.

Ein deutliches optisches Signal, ausgehend von markierten senilen Plaques in 100 μm dicken Alzheimerhirnschnitten, war nach Behandlung mit D-Peptid-Konzentrationen von 50 bis 500 μM und 750 pmolen Cy5.5 im SANIRF zu messen. Die Signifikanz dieser Messergebnisse ließ sich durch statistische Tests und Wiederholung der Versuchsreihe belegen. Im Vergleich mit anderen Untersuchungen wurde eine spezifische Markierung von senilen Plaques bereits mit 5 μM Fluorescein-gekoppeltem-D-Peptid in Alzheimerhirngewebsschnitten erreicht (Wiesehan et al. 2003). Jedoch erfolgte dieser Nachweis unter Verwendung eines Fluoreszenzmikroskopes und nicht in einem Ganzkörperdetektor, dessen Parameter für die Bildgebung von Fluoreszenz in Kleintieren optimiert wurden. Auch wurden bei der Vergleichsgruppe nur Hirngewebsschnitte von 5 μm Dicke verwendet, was ebenfalls eine geringere Konzentration des D-Peptides erklärt. Ein System, das ein D-Petid als Bestandteil

einer fluorochromen Sonde zum Nachweis von Alzheimerplaques aufweist, ist in der Literatur bisher nicht beschrieben. Deshalb ist es nicht möglich Konzentrationen des D-Peptids zur spezifischen Anfärbung von β A4-Protein zu vergleichen. Im Gegensatz zu anderen Systemen zum Nachweis von Alzheimerplaques ist die Konzentration der verwendeten two-step fluorochromen Sonde äußerst gering. Die Werte liegen z.B. deutlich unter den Konzentrationen an BSB (200 μ M bis 10 mM) zum Nachweis von β A4-Protein in 5 μ m Alzheimerhirnschnitten (Skovronsky et al. 2000). Eine Inkubation eines 100 μ m Hirnschnittes würde (im Vergleich zur verwendeten two-step fluorochromen Sonde) also eine deutlich höhere Menge an BSB erfordern.

Die spezifische Anfärbung von Alzheimerplaques mit der two-step fluorochromen Sonde ist gelungen. Es zeigte sich jedoch unter in vitro Bedingungen erwartungsgemäß, dass je größer die Masse des verwendeten Alzheimerhirngewebes ist, desto höher muss die verwendete Konzentration der fluorochromen Sonde sein. Dies muss bei der angestrebten Darstellung von β A4-Plaques in vivo berücksichtigt werden, da das Volumen des Gehirns oder des Tumors in der Maus deutlich größer ist als das Volumen eines histologischen Gewebeschnittes. Vorteil einer Detektion von Alzheimerplaques in vivo ist, dass durch die Blutperfusion die Zugänglichkeit der fluorochromen Sonde in das Gewebe erleichtert wird, im Gegensatz zu den Hirnschnitten, bei denen die Sonde die β A4-Plaques nur durch Diffusion erreicht. Nachteil der Methode ist, dass nach Applikation der Sonde in eine Maus viele Barrieren überwunden werden müssen, bis die Sonde ihr Zieltarget erreicht. So ist bei einer Detektion von Alzheimerplaques in vivo die Blut-Hirn-Schranke ein limitierender Faktor, der überwunden werden muss. Weitere Faktoren sind die Absorption und Streuung der Fluoreszenz im Gewebe, wie die Ergebnisse der Phantomversuche zeigen, was vermutlich ebenfalls eine Erhöhung der Fluorochrommenge erfordern wird. Angaben über die notwendige Konzentration der fluorochromen Sonde in vivo können nach den durchgeführten Experimenten noch nicht getroffen werden. Einen Vergleich erlauben die von Weißleder et al. 1999 durchgeführten Versuche zur Tumordarstellung in Mäusen. Die dabei verwendete Menge an Cy5.5 pro Tier (10 μ mole) ist deutlich höher als die verwendete Menge Cy5.5 zur Darstellung von senilen Plaques in Alzheimerhirnschnitten (750 pmole Cy5.5). Eine solche Menge der fluorochromen Sonde muss vor ihrer Anwendung in vivo auf ihre Citotoxizität getestet werden. Die Cytotoxizität des Cy5.5-Fluoreszenzfarbstoffes wurde in dieser Studie nicht überprüft, jedoch findet der verwandte Cyaninfarbstoff Indocyaningrün bereits klinische Anwendung bei der Angiographie der Retina und bei Leberfunktionstests. Dabei wurde eine

sehr geringe Nebenwirkungsrate (0,15%) des Cyaninfarbstoffes festgestellt (Hope-Ross et al. 1994). Die Cytotoxizität ist abhängig von der Konzentration des Fluorochroms. In dieser Studie wurden zur Schnittfärbung 750 pmole Cy5.5 verwendet. Weißleder et al. 1999 verwendete zur Tumordarstellung 10 μ mole Cy5.5 pro Maus, also die 13333fache Menge in Bezug zu der dargestellten Schnittfärbung von Alzheimerpatienten (Weißleder et al. 1999). Dabei wurde keine cytotoxische Wirkung des Fluorochroms beobachtet, was auch beim Menschen auf geringe derartige Nebenwirkungen schließen läßt. Jedoch muß dies noch in weiterführenden Untersuchungen geprüft werden. Auch das D-Peptid besitzt vermutlich geringe immunogene Wirkungen. Durch seine Struktur kann es von Proteasen nicht erkannt und gespalten werden und löst gegenüber L-Peptiden eine geringere Immunantwort aus. Es würde demnach nach Applikation in den menschlichen Körper weniger Nebenwirkungen induzieren (Schuhmacher et al. 1996, Wiesehan 1997).

Die Untersuchungen haben erwiesen, dass sich Alzheimerplaques durch eine Kopplung zwischen dem D-Peptid und dem Fluoreszenzfarbstoff Cy5.5 über Brückenmoleküle spezifisch markieren und im Ganzkörper-Fluoreszenzdetektor darstellen lassen. Diese Kopplung wurde durch die hohe Affinität (Dissoziationskonstante: 10^{-15} M) der Brückenmoleküle Biotin und Streptavidin erreicht. Unter diesem Aspekt ist diese two-step fluorochrome Sonde zur Bildgebung von senilen Ablagerungen optimal. Auch wurde die Streptavidin-Biotin-Methode bereits in vivo in einem two-step bzw. three-step Verfahren zur Tumordiagnostik erfolgreich angewandt (Grana et al. 1996). Verwendet man Streptavidin und Biotin in einem three-step-Verfahren (biotinyliertes Substrat-Streptavidin-biotinylierter optisch aktiver Ligand), kommt es sogar zu einer Signalamplifikation, da Streptavidin vier Moleküle Biotin binden kann (Grana et al. 1996). Die Streptavidin-Biotin-Methode hat jedoch den Nachteil, dass sie sehr zeitaufwendig (2-3 Tage) ist (Grana et al. 1996, Cremonesi et al. 1999). Außerdem können diese Xenoproteine eine Immunantwort hervorrufen (Kalofonos et al. 1990, Paganelli et al. 1995). So kam es bei der Anwendung der Streptavidin-Biotin-Methode während der Tumordetektion bei 5% der Patienten zu einer Immunreaktion nach Applikation von 2 mg eines biotinylierten Antikörpers und bei 70% zu Reaktionen nach Gabe von 5 mg Streptavidin (Grana et al. 1996). Wegen dieser hohen Immunogenität kommt eine Detektion von Alzheimerplaques in vivo mit der Streptavidin-Biotin-Methode vermutlich nicht in Frage. Jedoch zeigen die vorliegenden Versuche, dass eine Verbindung der beiden Komponenten D-Peptid und Cy5.5 zu einer one-step fluorochromen Sonde ohne Verwendung der Brückenmoleküle Biotin und Avidin grundsätzlich möglich ist. Für die Zukunft wäre es

ein Vorteil, andere Brückenmoleküle zu entwickeln, die die gleichen Vorteile (hohe Bindungsaffinität, Signalamplifikation) aufweisen, jedoch mit einer geringeren Immunität behaftet sind.

5.1.1 Konzeption und Erprobung einer one-step fluorochromen Sonde zur Detektion von Alzheimerplaques im SANIRF-Imager

Die Resultate zeigen, dass signifikante Fluoreszenzintensitäten nur bei den mit dem fluorochrom-markierten D-Peptid inkubierten Alzheimergewebe im Prototyp-Ganzkörper-Fluoreszenzdetektor detektiert werden konnten. Das ebenfalls mit der one-step fluorochromen Sonde behandelte Nicht-Alzheimergewebe wies, wie die nur mit Blocklösung inkubierten Hirngewebsschnitte, keine messbaren Fluoreszenzintensitäten auf. Dies belegt, dass eine spezifische Markierung der Alzheimerplaques auch mit der konstruierten one-step fluorochromen Sonde erfolgreich war und deren Darstellung in einem Ganzkörper-Fluoreszenzdetektor möglich ist. Die Konstruktion der Sonde war äußerst zeitintensiv und kostspielig, weshalb im Rahmen dieser Arbeit nur eine Versuchsreihe durchgeführt werden konnte. Bei der spezifischen Detektion von β A4-Plaques ist zu erwähnen, dass senile Ablagerungen auch im normalen Altersgehirn zu finden sind. Allerdings liegt die Zahl im Alzheimergehirn mit durchschnittlich 15 Ablagerungen pro mm^2 im Spätstadium der Erkrankung deutlich höher (Kleihues et al. 2001). Deshalb muss in weiterführenden Versuchen eine Nachweisgrenze definiert werden.

Bei der Darstellung von β A4-Plaques im Prototyp-Ganzkörper-Fluoreszenzdetektor mit der one-step oder der two-step fluorochromen Sonde zeigten sich vergleichbare Fluoreszenzintensitäten. Die verwendeten Proteinmengen des D-Peptids waren in beiden Ansätzen gleich ($50\mu\text{M}$). Bei den Nicht-Alzheimerhirngewebsschnitten fiel jedoch auf, dass es durch das Fluorochrom der two-step fluorochromen Sonde zu leichten, unspezifischen Anfärbungen des Gewebes kam, wohingegen bei Inkubation mit der one-step fluorochromen Sonde keine erhöhte Fluoreszenzintensität messbar war. Somit ist die Behandlung mit der one-step fluorochromen Sonde der two-step fluorochromen Sonde hinsichtlich einer Bildgebung im Prototyp-Ganzkörper-Fluoreszenzdetektor überlegen, da sie bei äquivalenter Konzentration weniger unspezifische Markierungen aufweist. Dieser Fakt und die bereits in 5.1 beschriebene hohe Immunogenität der two-step fluorochromen Sonde sind die Gründe, warum für eine in vivo Versuchsreihe die one-step fluorochrome Sonde mit hoher

Wahrscheinlichkeit überlegen sein wird. In Analogie zu der two-step fluorochromen Sonde konnten Alzheimerplaques ebenfalls erst in Hirngewebschnitten mit einer Dicke von 100 µm dargestellt werden.

Die spezifische Markierung von senilen Plaques zeigt, dass D-Peptid und der Cy5.5-Fluoreszenzfarbstoff erfolgreich zu einer hochspezifischen Sonde verbunden wurden. Durch HPLC wurde eine Möglichkeit gefunden, die Sonde von ungekoppeltem D-Peptid zu trennen und diese zur weiteren Verwendung aufzufangen. Die Spektrofluorometrie hat sich dabei als hilfreiche Methode zur Überwachung der fluorochromen Kopplung erwiesen. Kopplung, Trennung und Analyse sind sehr zeitaufwendig, auch konnte während der HPLC nur eine analytische Trennung durchgeführt werden. Es war daher nur möglich, Lösungen bis zu einem Volumen von 100 µl in einem HPLC-Lauf durchzuschleusen. Aus diesem Grund musste die zu trennende Inkubationslösung vakuumkonzentriert werden. Bei einer solchen Einengung besteht die Gefahr, dass der Farbstoff gequenchet wird und so seine Fluoreszenzintensität verliert (Seidel et al. 2001). Die Ergebnisse zeigen jedoch, dass die Fluoreszenzintensität der Sonde durch die beschriebene Behandlung nicht beeinträchtigt wird. Ausführliche Literaturrecherchen ergaben, dass in der vorliegenden Studie das erstmals ein D-Peptid als Bestandteil einer fluorochromen Sonde, zur Darstellung von Amyloidablagerungen verwendet wurde. Bisherige Ansätze zu Detektion von β A4-Plaques durch Peptidsonden arbeiteten ausschließlich mit Peptiden, die aus L-Aminosäuren bestanden. Bei einer Applikation eines L-Peptids in vivo in den menschlichen Körper kommt es zum Abbau durch körpereigene Proteasen, wodurch immunogene Reaktionen hervorgerufen werden können. Deshalb ist ein D-Enantiomer, wie es in unserer Studie zur Anwendung kam, vorteilhaft. Beispielsweise wurde das β A4₁₋₄₀ L-Protein zum einen mit Gadolinium und zum anderen mit monocristallinen Eisenoxid Nanopartikeln (MION) gekoppelt und in die Arteria carotis der Maus appliziert. Zur Öffnung der Blut-Hirn-Schranke wurden die Sonden mit Mannitol verabreicht. Beide Sonden markierten die Alzheimerplaques spezifisch und konnten in vivo in der Maus mittels Magnetresonanz-Microimaging nachgewiesen werden (Wadghiri et al. 2003). Alternativ zur erprobten Methode könnte das untersuchte D-Peptid auch mit den beschriebenen Liganden, Gadolinium oder monocristallinen Eisenoxid Nanopartikeln (MION) gekoppelt werden, um mit anderen optischen Methoden darstellbar zu sein.

Im Ergebnis ist es gelungen eine auf einem D-Peptid basierende Sonde zu konzipieren, die in einem Prototyp-Ganzkörper-Fluoreszenzdetektor, der für Kleintiere optimiert wurde, die

Anwesenheit von β A4-Plaques anzeigt. Im Vergleich dazu werden in der Literatur Ansätze zum Nachweis von Alzheimerplaques mit konzipierten Sonden durch Multiphoton Mikroskopie beschrieben. Dazu wurden fluorochem-markiertes β A4₁₋₄₀ (Bacskaï et al. 2001a) oder fluorochem-markierte Antikörper (Bacskaï et al. 2001b) zur in vivo Darstellung der senilen Plaques direkt in den Cortex von transgenen Mäusen appliziert. Weiterhin wurden die Derivate des Congorots, methoxy-XO4 (Klunk et al. 2002) und des thioflavin T, BTA-1 (Mathis et al. 2002), die die Blut-Hirn Schranke überwinden können, intravenös bzw. intraperitoneal appliziert. Diese markierten die senilen Ablagerungen spezifisch und konnten in vivo nachgewiesen werden, jedoch war die Detektion nur nach Craniotomie möglich, da die Multiphoton Mikroskopie nur eine Eindringtiefe von unter 500 μ m aufweist. Diese Eindringtiefe ist für eine in vivo Detektion von Alzheimerplaques im menschlichen Gehirn zu gering. Während alle diese beschriebenen Methoden invasiv sind, wurden mit der vorliegenden Studie erste Schritte zu einer nicht-invasiven Bildgebung von β A4-Ablagerungen gemacht.

5.2 Erprobung eines Fluorochroms an Phantomen

Die Ergebnisse zur Bestimmung der Ein- bzw. Durchdringtiefe der emittierten Fluoreszenz des Fluorochroms in Hirngewebe zeigen, dass unter den gegebenen Bedingungen eine Hirngewebsschichtdicke bis 5 mm überwunden werden kann. Allerdings wurden die Messungen durch die weiche Konsistenz des Hirngewebes erschwert, was zu Ungenauigkeiten ($\pm 0,1$ mm) bei der Bestimmung der Schichtdicke führte. Außerdem war die Abschwächung der Fluoreszenz durch graue und weiße Hirnsubstanz unterschiedlich stark und diese Gewebeunterschiede sollten deshalb in weiteren Studien berücksichtigt und getrennt voneinander untersucht werden. Das begründet auch die Tatsache, dass die Farbstoffprobe mit 450 pmol Cy5.5 bei allen untersuchten Laserleistungen (0,2 bis 1 W) und einer Hirngewebsdicke von 5 mm überdurchschnittlich hohe Standardabweichungen aufweist.

Der beobachtete, deutlich exponentielle Abfall der Fluoreszenzintensitäten bei zunehmender Hirngewebsdicke zeigt, dass Gewebe das Fluoreszenzsignal des Cy-Farbstoffes abschwächt. Dies erklärt sich dadurch, dass der Durchtritt von Licht durch Gewebe von vier Größen beeinflusst wird: der Reflexion, der Streuung, der Absorption und der Transmission der

Photonen. Je dicker das Gewebe ist, desto stärker wird die Intensität des Lichts durch diese Phänomene verändert (König und Greulich 2003). Jede dieser Größen führt deshalb zu dem beobachteten Abfall der Fluoreszenzintensitäten des Modellfluorochroms. Die Untersuchungen wurden im sogenannten „diagnostischen Fenster“ durchgeführt, einem Messbereich von 650-900 nm (Nah-Infrarot-Bereich) in dem Hämoglobin, Wasser und Fett den niedrigsten Absorptionskoeffizienten haben und auch die Autofluoreszenz der Gewebe am geringsten ist (Weißleder und Ntziachristos 2003). Jedoch heißt das nur, dass diese Einflussgrößen minimiert und nicht ausgeschaltet wurden.

Die Resultate der in situ Applikation des Fluorochroms in Mäusegehirne zeigen ebenfalls, dass signifikante Fluoreszenzintensitäten durch Gewebeschichtdicken bis 5 mm im Ganzkörper-Fluoreszenzdetektor unter den gegebenen Bedingungen gemessen werden können. Im Vergleich zu den Versuchen zur Bestimmung der Eindringtiefe der emittierten Fluoreszenz in reines Hirngewebe fiel auf, dass bei gleicher Schichtdicke (5 mm) die minimal detektierbare Fluorochrommenge bei der in situ Applikation deutlich geringer ist (200 pmole Cy5.5 bei in situ Applikation, 750 pmole Cy5.5 bei reinem Hirngewebe, 0,2 W). Dies lässt sich dadurch erklären, dass nach direkter Applikation des Fluorochroms in das Gehirn einer Maus die emittierte Fluoreszenz verschiedene Gewebetypen wie Hirnsubstanz, Hirnhäute, Liquor, Schädelkalotte und Haut durchdringen muss. Jedes Gewebe absorbiert und streut das Licht unterschiedlich stark, je nach Beschaffenheit. Beispielsweise absorbiert Gewebe, das zum Großteil aus Wasser besteht, Licht weniger als Gewebe, das vorwiegend aus Fett besteht (Weissleder und Ntziachristos 2003), wodurch variiert die Eindringtiefe von NIR-Licht in die verschiedenen Gewebearten variiert. So zeigt Brustgewebe die geringste Absorption und NIR-Licht dringt bis zu 2,4 cm ein, Lungengewebe schwächt das Licht schon auf 1,5 bis 2 cm Eindringtiefe ab. Muskelgewebe lässt NIR-Licht bis ca. 1 cm hindurch und bei Hirngewebe werden beim heutigen Stand der Technik die geringsten Eindringtiefen von 0,4 bis 0,8 cm erreicht (Weissleder und Ntziachristos 2003). Die Messung mit dem Modellfluorochrom der vorliegenden Studie bestätigten diese Angaben, denn es wurden Eindringtiefen von 0,4 bis 0,5 cm im Hirngewebe gemessen. Die spezielle Eindringtiefe des verwendeten Fluorochroms Cy5.5 in Gehirn ist in der Literatur noch nicht beschrieben, jedoch wurde es bereits an Antikörper gekoppelt zur Tumordarstellung in Mäuseflanken angewandt. Dabei konnten Eindringtiefen von 7-10 mm erreicht werden (Weißleder et al. 1999), was aber auf die unterschiedliche Beschaffenheit des zu durchdringenden Gewebes (Muskeln und Haut) im Gegensatz zur Hirnsubstanz zurückzuführen ist.

Die beobachtete Abhängigkeit der Fluoreszenzintensität des Fluorochroms von der Gewebeschichtdicke bzw. -beschaffenheit ist für eine mögliche Detektion von Alzheimerplaques in vivo von entscheidender Bedeutung. Die β -Amyloid-Ablagerungen befinden sich im Neuropil, also direkt im Gehirngewebe selbst. Sie sind vor allem im Temporallappen, besonders im Hippocampus, und in späteren Stadien auch im Frontal- und Parietallappen des menschlichen Gehirns zu finden. Das bedeutet, dass bei einer in vivo Detektion des β A4-Proteins vermutlich die Fluoreszenzintensität zum einen durch das Gehirngewebe selbst, zum anderen aber auch durch die Hirnhäute, die Schädelkalotte und durch die äußere Haut abgeschwächt wird. Die humane Schädelkalotte hat bereits eine Dicke von 3 bis 8 mm (Thurn und Bücheler 1986), jedoch ist aufgrund ihres niedrigen Fett- und Wassergehaltes eine geringere Absorption der Fluoreszenzintensität als durch das Gehirngewebe selbst zu erwarten. Abgesehen von der beschriebenen Abschwächung ist die Konzentration des β A4-Proteins pro Gramm Alzheimerhirngewebe, wie nachfolgend beschrieben, ausreichend, um durch die konzipierte fluorochrome Sonde im Prototyp-Ganzkörper-Fluoreszenzdetektor dargestellt zu werden. Für eine Darstellung von Alzheimerplaques in vivo im menschlichen Gehirn muss deshalb ein Detektor konzipiert werden, der die beschriebenen Effekte berücksichtigt und behebt, um eine optimale Bildgebung zu erreichen.

Kein Intensitätsunterschied konnte im Vergleich eines Gehirnphantoms in einer Meßküvette und in einem Mäuseschädel bei gleicher Fluorochromkonzentration verzeichnet werden. Daraus lässt sich schließen, dass die Schädelkalotte der Maus sehr dünn ist und kaum eine signifikante Abschwächung der Fluorochromintensität bewirkt bzw. die Glasschicht der Meßküvette eine ähnlich Abschwächung der Intensität wie die Schädelkalotte aufweist. Dies zeigt, dass eine Detektion des Fluorochroms durch die Schädelkalotte einer Maus gut möglich ist und die Fluoreszenzintensität von der dünnen Knochenschicht kaum beeinträchtigt wird. Die beschriebene Detektionsmethode kann für die Alzheimerforschung an Tieren sehr hilfreich sein, um Effekte von Medikamenten auf den Verlauf des Morbus Alzheimer zu überprüfen. Für eine Diagnostik im Menschen sind aber noch weiterführende Untersuchungen erforderlich, da die Schädelkalotte der Maus papierdünn und daher nicht mit der Abschwächung der 3 bis 8 mm dicken Knochenschicht des Menschen vergleichbar ist. Der Einfluss der menschlichen Schädelkalotte muss in vertiefenden Studien erforscht werden.

Wie erwartet, wurde eine lineare Abhängigkeit des Fluoreszenzsignals von der Menge des Farbstoffes Cy5.5 bei gleicher Gewebsdicke und Laserleistung beobachtet. Diese Messungen wurden durch die Inhomogenität des Hirngewebes beeinflusst (hohe Standardabweichungen), jedoch zeigte sich die Abhängigkeit von der Farbstoffmenge bei allen Hirngewebsdicken (0 bis 5 mm) und allen verwendeten Laserleistungen (0,2 bis 1 W). Dabei wurde deutlich, dass eine minimale Fluorochrommenge von 750 pmolen noch signifikante Fluoreszenzintensitäten durch eine 5 mm dicke Hirngewebsschicht im Detektor hervorruft. Diese Mindestmenge und die lineare Abhängigkeit der Fluoreszenzintensität von der Fluorochrommenge sind entscheidend für eine mögliche in vivo Detektion von Alzheimerplaques. Dabei ist der Umfang des gebundenen Fluorochroms von der Menge an β -A4-Protein im Gehirngewebe abhängig. β A4-Plaques liegen im Gehirn eines Alzheimerpatienten in einer Größenordnung von >2000 pmole pro Gramm Alzheimerhirngewebe vor (Wang et al. 1999). Geht man davon aus, dass ein Molekül β -A4-Protein ein Molekül fluorochrome Sonde bindet, so wären 2000 pmole des Fluorochroms pro Gramm Hirngewebe vorhanden. Eine Menge von 2000 pmolen Cy5.5 muss ein Fluoreszenzsignal in einem Prototyp-Ganzkörper-Detektor hervorrufen, wenn im Vergleich 750 pmole Cy5.5 durch 5 mm Hirngewebe zu detektieren sind. Der Einfluss der menschlichen Schädelkalotte auf die Fluoreszenzintensität des Fluorochroms ist nicht bekannt und muss in weiterführenden Studien betrachtet werden.

Eine Erhöhung der Laserleistung verstärkte bei gleichen Hirngewebsdicken und gleichen Farbstoffkonzentrationen die Fluoreszenzintensität deutlich. Die Laserleistung des Prototyp-Ganzkörper-Fluoreszenzdetektors ist auf 1 W/Objektträger begrenzt. Die Intensität des Lasers ist durch die Spotgröße, also die Größe des bestrahlten Gebietes bestimmt. Je kleiner der Spot ist, desto höher wird die Intensität des Lasers. Um die erhaltenen Fluoreszenzintensitäten noch zu steigern, sollte deshalb das zu bestrahlende Areal möglichst gering gehalten werden (König und Greulich 2003). Eine Erhöhung der Laserleistung für eine in vivo Bildgebung ist durch Auftreten von Nebeneffekten (thermischen und nicht linearen Wechselwirkungen) begrenzt. Diese Nebeneffekte treten auf ab einer effektiven Laserleistung von 10 W/cm^2 im Zielgewebe. Die eingestellte Laserleistung des Prototyp-Ganzkörper-Fluoreszenzdetektors entspricht nicht der effektiven Laserleistung die das Zielgewebe erreicht. Der Verlust durch die Laseraufweitungseinheit beträgt 50% mit Anregungsfilter (Bandpass bei 675 nm). Zurückzuführen sind diese Verluste zu 17% auf die Faser Aus- und Einkopplung, zu 8% auf eine HALO-Linse und zu 25% auf den Anregungsfilter. Eine Optimierung der Laserleistung zur Steigerung der gemessenen Fluoreszenzsignale ist möglich, im höheren

Laserleistungsbereich unter Berücksichtigung der beschriebenen Nebeneffekten. Im Vergleich dazu wurden bereits eingestellte Laserleistungen bis 150 W/Tier in Kleintieren ohne deutliche Nebeneffekte angewandt, um Tumore mit fluorochrommarkierten Antikörpern darzustellen (Weißleder et al. 1999). In der Literatur ist eine Steigerung der Fluoreszenzintensität auch durch eine verlängerte Belichtungszeit beschrieben. Dieser Parameter wurde in der vorliegenden Arbeit nicht verändert und konstant bei 2 ms gehalten wurde. Untersuchungen zur Tumordiagnostik zeigen, dass eine Verlängerung der Belichtungszeit auf 30 s zu einer Steigerung der gemessenen Fluoreszenzsignale führt (Weißleder et al. 1999). Ein Detektor für eine in vivo Detektion von Alzheimerplaques im menschlichen Gehirn sollte deshalb unter Berücksichtigung der beschriebenen Tatsachen optimiert werden, um eine bessere Bildgebung zu erreichen. In zukünftigen Studien müssen auch unterschiedliche Belichtungszeiten angewandt werden, um eine weitere Steigerung der Fluoreszenzsignale zu ermöglichen.

Zusammenfassend zeigen die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit, dass eine Detektion von Fluorochromen durch Gehirngewebe und Schädelkalotte möglich ist. Das Problem der Abschwächung des NIR-Lichtes durch Gewebe ist komplex, die Zusammenhänge wurden in dieser Studie erkannt und analysiert. Für eine mögliche Anwendung der beschriebenen Methode in vivo im Menschen müssen deshalb noch weiterführende Studien durchgeführt und der Detektor optimiert werden. Mit dieser Studie wurden erste Schritte zu einer Diagnostik des Morbus Alzheimer im Menschen zurückgelegt. Für eine Anwendung der Methode in vivo in einem Mausmodell besteht keine Einschränkung, da Alzheimerplaques spezifisch durch das D-Peptid und den Fluoreszenzfarbstoff Cy5.5, als Bestandteile einer two-step fluorochromen Sonde, in Gehirngewebe im Prototyp-Ganzkörper-Fluoreszenzdetektor dargestellt werden konnten. Es gelang, die beiden Komponenten D-Peptid und Fluorochrom zu einer one-step fluorochromen Sonde zu verbinden; damit ließ sich ebenfalls das β A4-Protein in Hirngewebsschnitten im Detektor darstellen. Der Fluoreszenzfarbstoff Cy5.5 ruft im picomolaren Bereich durch eine 5 mm dicke Hirngewebsschicht, in Gehirnphantomen in präparierten Mäuseschädeln und nach in situ Applikation in Mäusegehirne im Prototyp-Ganzkörper-Fluoreszenzdetektor ein signifikantes Fluoreszenzsignal aus. Auch wurden die Rahmenbedingungen, die Laserleistung und eine optimale Konzentration des Fluorochroms, überprüft und analysiert. Die Erprobung der konzipierten Sonde kann nun am Tiermodell erfolgen, z.B. am Tiermodell von Hasio et al. 1996: Diese transgenen Mäuse weisen eine erhöhte Produktion von β -A4₁₋₄₂ auf und exprimieren β A4-Plaques im Gehirn. Zudem zeigen sie Gehirnschädigungen und Gedächtnisverlust.

6 Literaturverzeichnis

A Med-World AG. 2002. Biographie: Alois Alzheimer. Einsehbar in: <http://www.medicine-worldwide.de/persoennlichkeiten/alzheimer.html>T. Internetseite vom 10.07.2002. Eingesehen am 05.01.2003.

Activ Learning Group. 2001. Die Geschichte von Alois Alzheimer. Einsehbar in: <http://www.alzheimer-net.ch/infos/geschichte.html>. Internetseite vom 27.11.2001. Eingesehen am 05.01.2003.

Bacsikai BJ, Klunk WE, Mathis CA and Hyman BT. 2002. Imaging Amyloid- β Deposits in vivo. *J Cereb Blood Flow Metab*, 22:1035-1041.

Bacsikai BJ, Kajdasz R, Chritie WR, Zipfel RM, Williams KA, Kasischke W, Webb W and Hyman BT. 2001a. Cronic imaging of amyloid plaques in the live mouse brain using multiphoton microscopy. *Multiphoton Microsc Biomed Sci Proc SPIE*, 4262:125-133.

Bacsikai BJ, Kajdasz R, Chritie WR, Carter C, Games D, Seubert P, Schenk D and Hyman BT. 2001b. Imaging amyloid-beta deposits in brains of living mice permits direct observation of clearance of plaques with immunotherapy. *Nat Med*, 7:369-372.

Collins J, Röttgen P. 1997. Evolutives Phage Display, eine Methode als Grundlage eines Unternehmens. Einsehbar in http://bib.gbf.de/ergebnisbericht/1997/deutsch/sektion_b/b-collins.html. Internetseite vom 12.11.1997. Eingesehen am 05.01.2003.

Crankshaw CL, Marmion M and Luker GD. 1998. Novel technetium (III)-Q complexes for functional imaging of multidrug resistance (MDR1) P-glycoprotein. *J Nuc Med*, 39:77-86.

Cruts M, Backhovens H, Wang SY, van Gassen G, Theuns J, de Jonghe CD, Wehnert A, de Voecht J, de Winter G and Cras P. 1995. Molecular genetic analysis of familial early onset Alzheimer's disease linked to chromosome 14q24.3. *Hum Mol Genet*, 4:2363-2371.

Dodd SJ, Williams M. Suhan JP, Williams DS, Koretsky A and Ho C. 1999. Detection of single mammalian cells by high resolution magnetic resonance imaging. *Biophys J*, 76:103-109.

Grana C, Chinol M, Magnani P, Corti A, Sidoli A, Siccardi AG and Paganelli G. 1996. In vivo targeting based on the avidin-biotin system. *Tumor Targ*, 2:230-239.

Hansch A, Hilger I, Sauner D und Kaiser WA. 2003a. Autofluoreszenz von NADH/NADPH bei Arthritis [Abstract]. In: Keller M, Hrsg. Fortschritte auf dem Gebiet der Röntgenstrahlen und der bildgebenden Verfahren. 84. Deutscher Röntgenkongress. Stuttgart: Georg Thieme Verlag.

Hansch A, Sauner D, Hilger I, Frey O, Haas M, Malich A, Brauer R and Kaiser WA. 2003b. Noninvasive diagnosis of arthritis by autofluorescence. *Invest Radiol*, 38:578-83.

Hilger I, Leistner Y, Berndt A, Kosmehl H und Kaiser WA. 2003: NIR-Fluoreszenz-Bildgebung des Her-2-Proteins in Tumorzellen [Abstract]. In: Keller M, Hrsg. Fortschritte auf dem Gebiet der Röntgenstrahlen und der bildgebenden Verfahren. 84. Deutscher Röntgenkongress. Stuttgart: Georg Thieme Verlag.

Högemann D, Basilion JP and Weissleder R. 2001. Molekulare Bildgebung in der Magnetresonanztomographie und der Nuklearmedizin. *Radiologe*, 41:116-120.

Hope-Ross M, Yannuzzi LA, Gragoudas ES, Guyer DR, Slakter JS, Sorenson JA, Krupsky S, Orlock DA and Puliafito CA. 1994. Adverse reactions due to indocyanine green. *Opthalmology*, 101:529-533.

Horn R. 1996. Organische psychische Störungen. In: Möller HJ, Laux G und Deister A Hrsg. *Psychiatrie*. Erste Aufl. Stuttgart: Hippokrates Verlag, 182-190.

Hülser PJ. 1999. Die Alzheimer Krankheit. *Die Spritze*, 2:17-22.

Kalofonos HP, Rusckowsky M and Siebecker DA. 1990. Imaging of tumor in patients with indium-111-labeled biotin and streptavidin-conjugated antibodies: preliminary communication. *J Nucl Med*, 31:1791-1796.

Kang J, Lemaire HG, Unterbeck A, Salbaum JM, Masters CL, Grzeschik KH, Multhaup G, Beyreuther K and Muller-Hill B. 1987. The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor. *Nature*, 325:733-736.

Kleihues P, Kiessling M, Wiestler OD und Aguzzi A. 2001. Zentrales Nervensystem. In: Böcker W, Denk H und Heitz PU, Hrsg. Pathologie. Zweite Aufl. München, Jena: Urban & Fischer Verlag, 302-304.

Klunk WE, Bacskai BJ, Mathis CA, Kajdasz ST, McLellan ME, Frosch MP, Debnath ML, Holt DP, Wang Y and Hyman BT. 2002. Imaging A β plaques in living transgenic mice with multiphoton microscopy and methoxy-XO4, a systemically administered Congo red derivative. J Neuropathol Exp Neurol, 61:797-805.

König K und Greulich KO. 2003. Vorlesungsreihe „Laser in Biologie und Medizin: Wechselwirkung von Laserstrahlung mit Zellen und Gewebe. Einsehbar in: <http://www.mit.uni-jena.de/~i6koka/Vorlesung.html>. Internetseite vom 29.03.2000. Eingesehen am 21.06.2003.

Kunicki S, Richardson J, Metha PD, Kim KS and Zorychta E. 1998. The effects of age, apolipoprotein E phenotype and gender on the concentration of amyloid- β (A β) 40, A β 42, apolipoprotein E and transthyretin in human cerebrospinal fluid. Clin Biochem, 31:409-415.

Luker GD, Fracasso PM, Dobkin J and Piwnica-Worms D. 1997. Modulation of the multidrug resistance P-glycoprotein: detection with technetium-99m-sestamibi in vivo. J Nuc Med, 38:369-372.

Marriot CJ, Cadorette JE, Lecomte R, Scasnar V, Rousseau J and van Lier JE. 1994. Highresolution PET imaging and quantitation of pharmaceutical biodistributions in a small animal using avalanche photodiode detectors. J Nuc Med, 35:1390-1396.

Mathis CA, Bacskai BJ, Kajdasz ST, McLellan ME, Frosch MP, Hyman BT, Holt DP, Wang Y, Huang GF, Debnath ML and Klunk WE. 2002. A lipophilic thioflavin-T derivative for positron emissions tomography (PET) imaging of amyloid in brain. Bioorg Med Chem Lett, 12:295-298.

Michels P und Welde H. 2003. Die Evolution des menschlichen Gehirns. Einsehbar in: <http://www.cognition.iig.uni-freiburg.de/team/members/hemforth/Evolution/.../allometrie.ht>. Internetseite vom 24.02.2003. Eingesehen am: 30.07.2003.

Novartis. 2002. Die Alzheimer-Krankheit: Basisinformationen über die Erkrankung, Untersuchungen. Einsehbar in: http://www.at.novartis.com/themes/ai_alz/alz244.htm. Internetseite vom 27.08.2002. Eingesehen am 05.01.2003.

Oyama F, Sawamura N, Kobayashi K, Morishima-Kawashima M, Kuramochi T, Ito M, Tomita T, Maruyama K, Saido TC, Iwatsubo T, Capell A, Walter J, Grünberg J, Ueyama Y, Haass C and Ihara Y. 1998. Mutant presenilin 2 transgenic mouse: effect on an age-dependent increase of amyloid β -protein 42 in the brain. *J Neurochem*, 71:313-322.

Paganelli G, Magnani P and Zito F. 1995. Optimization of the three-step pretargeting approach for diagnosis and therapy in cancer patients. *Cancer Res*, 51:5960-5966.

Pahnke J, Walker LC, Schroeder E, Vogelsang S, Stausske D, Walther R, Warzok RW. 2003. Cerebral β -amyloid deposition is augmented by the -491AA promoter polymorphism in non-demented elderly individuals bearing the apolipoprotein E ϵ 4 allele. *Acta Neuropathol*, 105:25-29.

Price JM, Chi X, Hellermann G and Sutton ET. 2001. Physiological levels of β -amyloid induce cerebral vessel dysfunction and reduce endothelial nitric oxide production. *Neurol Res*, 23:506-512.

Pschyrembel W, Hrsg. 1996. Pschyrembel Klinisches Wörterbuch, 257. neu bearb. Aufl. Berlin, New York: Walter de Gruyter Verlag, 48-49.

Rapoport SI. 1997. Discriminant analysis of brain imaging data identifies subjects with early Alzheimer's disease. *Int Psychogeriatr*, 9:229-235, 247-252.

Rocchi A, Pellegrini S, Siciliano G and Murri L. 2003. Causative and susceptibility genes for Alzheimer's disease: a review. *Brain Res Bull*, 30:1-24.

Rogaev EI, Sherrington R, Rogaeva EA, Levesque G, Ikeda M, Liang Y, Chi H, Lin C, Holman K and Tsuda T. 1995. Familial Alzheimer's disease in kindreds with missense mutations in a gene on chromosome 1 related to the Alzheimer's disease type 3 gene. *Nature*, 376:775-778.

- Schellingerhout D, Bogdanov A, Marecos E, Spear M, Brakefield X and Weissleder R. 1998.** Mapping the in vivo distribution of herpes simplex virions. *Hum Gene Ther*, 9:1543-1549.
- Schoepf U, Marecos E, Melder R, Jain R and Weissleder R. 1998.** Intracellular magnetic labeling of lymphocytes for in vivo trafficking studies. *Biotechniques*, 24:642-651.
- Schonknecht P, Pantel J and Schroder J. 2001.** Quantitative magnetic resonance tomography in diagnosis of Alzheimer dementia. *Z Gerontol Geriatr*, 34:101-107.
- Schumacher TNM, Mayr LM, Minor DL, Milhollen MA, Burgess MW and Kim PS. 1996.** Identification of D-Peptid ligands through mirror-image phage display. *Science*, 271:1854-1858.
- Selkoe DJ. 1998.** The cell biology of β -amyloid precursor protein and presenilin in Alzheimer's disease. *Cell Biology*, 8:447-453.
- Skovronsky DM, Zhang B, Kung MP, Kung HF, Trojanowski JQ and Lee VM. 2000.** In vivo detection of amyloid plaques in a mouse model of Alzheimer's disease. *PNAS*, 97:7609-7614.
- Slakter JS, Yannuzzi LA, Guyer DR, Sorensen JA and Orlock DA. 1995.** Indocyanine-green angiography. *Curr Opin Ophthalmol*, 6:25-32.
- Thurn P, Bücheler E. 1986.** Röntgendiagnostik der Knochen und Gelenke. In: Thurn P, Bücheler E, Hrsg. Einführung in die radiologische Diagnostik. Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag, 124-125.
- Tyagi S, Kramer FR. 1996.** Molecular beacons probes that fluorescence upon hybridisation. *Nat Biotechnol*, 14:303-308.
- Von Rückmann A, Schmidt KG, Fitzke FW, Bird AC and Jacobi KW. 1999.** Autofluorescence of the retinal pigment epithelium in patients with central serous chorioretinopathy. *Ophthalmologie*, 96:6-10.

- Wadghiri YZ, Sigurdsson EM, Sadowski M, Elliott JI, Li Y, Scholtzova H, Tang CY, Aquilnaldo G, Pappolla M, Duff K, Wisniewski T and Turnbull DH. 2003.** Detection of Alzheimer's disease in transgenic mice using magnetic resonance microimaging. *Mag Resonance Med*, 50:000-000.
- Wang J, Dickson DW, Trojanowski JQ, Lee VM. 1999.** The levels of soluble versus insoluble brain Abeta distinguish Alzheimer's disease from normal and pathologic aging. *Exp Neurol*, 158:328-337.
- Wawrzinek A. 2002.** Neuer Test zur Früherkennung von Alzheimer. Einsehbar in: <http://www.wissenschaft.de/sixcms/detail.php?id=127496>. Internetseite vom 26.07.2002. Eingesehen am 26.07.2002.
- Weissleder R. 1999.** Molecular Imaging: Exploring the Next Frontier. *Radiology*, 212:609-614.
- Weissleder R, Mahmood U. 2001.** Molecular Imaging. *Radiology*, 219:316-333.
- Weissleder R, Ntziachristos V. 2003.** Shedding light onto live molecular targets. *Nat Med*, 9:123-128.
- Weissleder R, Tung CH, Mahmood U and Bogdanov. 1999.** In vivo imaging of tumors with protease-activated near-infrared fluorescent probes. *Nature Biotech*, 17:375-378.
- Wiesehan K. 2003.** Identifizierung und Charakterisierung eines spezifischen Liganden für das Alzheimer Amyloid- β -Peptid (A β) [Dissertation]. Bayreuth: Universität Bayreuth.
- Wiesehan K, Buder K, Linke RP, Patt S, Stoldt M, Unger E, Schmitt B, Bucci E and Willbold D. 2003.** Selection of D-amino-acid peptides that bind to Alzheimer's disease amyloid peptide A₁₋₄₂ by mirror phage display. *Chem Bio Chem*, 4:748-753.
- Wong CW, Quaranta V and Glenner GG. 1985.** Neuritic plaques and cerebrovascular amyloid in Alzheimer disease are antigenically related. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.*, 82:8729-8732.
- Zeeck A, Eick S, Krone B und Schröder K, Hrsg. 1997.** Chemie für Mediziner. Dritte Aufl. München; Wien; Baltimore: Urban und Schwarzenberg, 243-248.

7 Anhang

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen, die mich bei der Durchführung und Fertigstellung der vorliegenden Arbeit unterstützt haben, herzlich bedanken. Besonderer Dank gilt:

Prof. Dr. med. Dipl.-Chem. Werner A. Kaiser für die Möglichkeit im Institut für Diagnostische und Interventionelle Radiologie eine Dissertation zu verfassen

Frau PD Dr. rer. nat. habil. Ingrid Hilger für die Vergabe des interessanten Themas, die ausgezeichnete und herzliche Betreuung und die zahlreichen Ratschläge und Diskussionen

Frau Yvonne Heyne und Frau Brigitte Maron für die viele hilfreichen Tipps und die freundschaftliche Zusammenarbeit

Prof. rer. nat. habil. Dieter Willbold für die Bereitstellung des D-Peptids

Prof. Dr. med. habil. Stephan Patt für die Bereitstellung und **Frau Klupsch und Herrn Dr. med. Michael Brodhun** für die Anfertigung der Hirngewebschnitte

Axel Dübner, Juliane Keil, Yvonne Leistner und Susanne Polloczek für die moralische Unterstützung und die zahlreichen Tipps am Arbeitsplatz

Meinen Eltern Britta und Klaus-Peter Albrecht für die großzügige Unterstützung

Swetlana und Jens Daberkow für die Einweisung in die Deutsche Rechtschreibung

Allen meinen Freunden für deren Geduld, meine wechselnden Launen zu ertragen und ihre aufbauenden Worte.

Lebenslauf

Name: Wiebke Brigitte Albrecht
 Geboren am: 20. April 1979 in Lauterbach/Hessen
 Anschrift: Frommannstraße 6, 07743 Jena

Schulbildung:

9/85-7/89 Grundschole Storndorf
 9/89-7/95 Unterstufe des Albert-Schweitzer-Gymnasiums in Alsfeld
 9/95-7/96 High School Jahr in Spring Lake, Michigan, USA
 9/96-6/98 Oberstufe des Albert-Schweitzer-Gymnasiums in Alsfeld
 6/98 Abitur

Praktika

3/99 Pflegepraktikum im Kreiskrankenhaus Lauterbach
 3/00 Pflegepraktikum im Mercy Hospital in Muskegon, Michigan, USA
 3/01 Famulatur im Kreiskrankenhaus Lauterbach (Chirurgie)
 3/02 Famulatur in einer chirurgischen Praxis in Malchow
 8/03 Famulatur im Kreiskrankenhaus Lauterbach (Gynäkologie)

Hochschulbildung:

10/98-heute Medizinstudium an der Friedrich-Schiller-Universität Jena
 10/98-9/00 4 vorklinische Semester
 09/00 Ärztliche Vorprüfung
 10/99-9/03 6 klinische Semester
 09/01 Erster Abschnitt der Ärztlichen Vorprüfung
 4/02-heute Promotion

Veröffentlichungen:

Hilger I, Albrecht W, Patt S, Brodhun M, Wiesehan K, Willbold D und Kaiser WA (submitted): Non-invasive detection of Alzheimer's disease by near fluorescence optical methods. Academic Radiology.

Hilger I, Albrecht W, Wiesehan K, Patt S, Hoppe M, Haas M, Willbold D und Kaiser WA. 2003. NIR-Bildgebung der Alzheimer-Amyloid-Plaques: Eine in vitro Machbarkeitsstudie [Abstract]. In: Keller M, Hrsg. Fortschritte auf dem Gebiet der Röntgenstrahlen und der bildgebenden Verfahren. 84. Deutscher Röntgenkongress. Stuttgart: Georg Thieme Verlag.

Jena, den 17.02.2004

Wiebke Albrecht

Ehrenwörtliche Erklärung:

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben: PD Dr. rer. nat. habil. Ingrid Hilger,

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Jena, den 17.02.2004

Wiebke Albrecht